

Tatiane Cristofolini

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS COMO SISTEMAS DE ENTREGA DE siRNA EM
LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE MAMA HER-2
POSITIVO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Farmácia.

Orientador: Prof^a. Dra. Tânia Beatriz
Creczynski Pasa

Co-orientador: Prof. Dr. Frederico
Pittella Silva

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cristofolini, Tatiane
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
COMO SISTEMAS DE ENTREGA DE siRNA EM LINHAGEM CELULAR DE
CÂNCER DE MAMA HER-2 POSITIVO / Tatiane Cristofolini ;
orientadora, Tânia Beatriz Creczynski Pasa ;
coorientador, Frederico Pittella Silva. - Florianópolis,
SC, 2016.
119 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. RNA de interferência. 3. siRNA. 4.
Nanopartículas magnéticas. 5. Câncer de mama HER-2 positivo.
I. Creczynski Pasa, Tânia Beatriz. II. Pittella Silva,
Frederico. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Tatiane Cristofolini

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS COMO SISTEMAS DE ENTREGA DE siRNA
EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE MAMA
HER-2 POSITIVO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Farmácia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2016.

Prof.^a. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Curso de Pós- Graduação em Farmácia

Banca Examinadora:

Orientadora: Prof.^a Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Co-orientador: Prof. Dr. Frederico Pittella Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Prof.^a., Dra. Simone Goncalves Cardoso
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Membro Titular

Prof.^a., Diva Sonaglio
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Membro Titular

Prof., Dr. Marcelo Farina
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Membro Titular

AGRADECIMENTOS

“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida, na verdade, é para quem é corajoso o suficiente para arriscar-se e humilde o bastante para aprender.”

Primeiramente gostaria de agradecer à professora e orientadora Tânia Beatriz Creczynski Pasa pelo apoio e incentivo durante esses 8 anos. Por ter acreditado e dado a oportunidade de fazer parte da família GEIMM. Muito obrigada por todos os ensinamentos, conversas e debates científicos, e também pela experiência, amizade e confiança.

Ao meu co-orientador Frederico Pittella Silva, que mesmo longe, sempre se mostrou preocupado e pronto para ajudar. Agradeço por ter acreditado, confiado e incentivado desde o início. Muito obrigada por todas as conversas, por ter compartilhado seu conhecimento e principalmente pelo carinho e amizade.

Ao amigo e colega de laboratório Jelver Alexander Sierra Restrepo, sua ajuda, comprometimento e paciência foram fundamentais para esse trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos e disponibilidade, além de todas as conversas, *happy hours* e risadas.

Ao “*nanogroup*”, Gabriela Regina Rosa Souza, Leônidas João de Melo Júnior e Milene Dalmina por todas as discussões científicas e estarem sempre prontos para ajudar. Muito obrigada pelo aprendizado, dedicação e amizade.

À família GEIMM, pelo companheirismo, troca de experiências e ajudas, sem falar dos cafés, bolos e momentos de descontração. Cada um participou de alguma forma especial no desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada à Laura Sartori Assunção, Júlia Cisilotto e Adny Henrique Silva pelo carinho, amizade, e apoio diário além de todas as jantinhas, forrós, conversas e risadas juntas.

À professora Fabíola Branco Filippin Monteiro, por ter guiado-me durante a iniciação científica e ter compartilhado seu conhecimento e sabedoria.

Agradeço à dona piriguete, Ivonete Agapito, por cuidar e manter o laboratório sempre em ordem para que conseguíssemos trabalhar, e também por preocupar-se e tratar-nos com todo carinho.

Aos meus pais, Gilmar e Lenize, meu irmão Michel e minha cunhada Alessandra por serem meu porto seguro e estarem sempre do meu lado incentivando. Só tenho a agradecer tudo o que vocês fizeram por mim, amo vocês.

Às gurias do basquete, Rafa, Déia, Marina, Lara, Dani, Clara e Joana por serem minhas grandes amigas e fazerem eu esquecer a parte científica. Muito obrigada por todo apoio e momentos juntas. Por todas as festas, churras, pizzas, vinhos e bolos, sem esquecer das noites de *Guitar Hero* e *Just Dance*. Não podia esquecer do Paulo, muito além de técnico, um amigo, um segundo pai, que se preocupa e cuida de todas nós. Sem vocês não teria graça.

À Fernanda Alves da Cruz pela amizade e carinho nesses 9 anos. Por ser minha eterna dupla e termos passado tantas coisas juntas. Agradeço por todos os almoços, jantas, bares, festas e conversas, por estar sempre pronta para ouvir e ajudar. Muito obrigada por apresentar a Tatiana Lima Alves e Daiana Faoro, um pedacinho do Paraná que já tenho muito carinho e guardo no coração.

Ao Jeferson Araújo Gonçalves, além de colega de laboratório e vizinho, um amigo de longa data! Muito obrigada por ser essa pessoa atenciosa, querida, companheira, sempre pronta e disposta a ajudar.

Aos amigos Leandro Andrade, Bruno Espirito Santo e Rafael Oki, por todo o carinho, jantas e alegrias juntos. Ao meu amigo Rafael Alves por todas as risadas, apoio, incentivo e momentos juntos. Nunca vou esquecer do “Mas é claro que você vai fazer mestrado!”.

As amigas Paula Monteiro, Camila Fernanda Konell, Natália da Costa Piccoli e Máisa Pompermaier Rotunno, por estarem do meu lado desde o início da faculdade e pelo carinho, incentivo e parceria de sempre.

Às amigas Paloma Farina de Lima e Gabriela Maas Vieira que mesmo longe, estiveram presente em toda minha jornada.

Aos membros da banca examinadora, meus agradecimentos pela contribuição e disponibilidade de avaliar meu trabalho.

Ao programa de Pós Graduação em Farmácia da UFSC, que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPQ, CAPES e FAPESC, pelo suporte financeiro.

A todos os amigos que de alguma forma me fizeram mais feliz e contribuíram com a minha trajetória e trabalho, muito obrigada!

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais diagnosticado no mundo e representa a principal causa de morte entre as mulheres. Cerca de 20% dos casos apresentam a superexpressão da proteína HER-2 o que garante pior prognóstico devido à agressividade do tumor, alto poder metastático e recidiva. Devido aos diversos mecanismos de resistência às terapias convencionais evidencia-se a necessidade de tratamentos mais efetivos. Neste contexto, a utilização do efeito de RNA de interferência (RNAi) apresenta-se como alternativa, por possibilitar o controle da produção de proteínas através da interferência sequência-específica. Devido às características da molécula de siRNA e barreiras biológicas, a utilização de sistemas nanocarreadores apresenta-se como estratégia para proteção e transporte à célula alvo. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e aplicar um novo sistema nanocarreador de siRNA para a terapia anticâncer. As IO-*caf*@CaP/siHER2/PEG-PAsp correspondem a um sistema formado por um núcleo magnético recoberto com ácido cafeico, sais inorgânicos, siRNA e bloco de copolímero. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) revelaram nanopartículas esféricas e as medidas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) apresentaram diâmetro médio por intensidade de 134,70 nm e índice de polidispersão de 0,163. A formulação apresentou carga superficial igual a -3,06 e concentração de $6,49 \times 10^{12}$ partículas/mL na análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). As partículas mostraram-se estáveis após 42 dias de armazenamento e liofilização. A taxa de incorporação de siRNA variou de 87 a 99%. De acordo com estudos de citotoxicidade as nanopartículas não apresentaram toxicidade às células HCC1954 além disto aumentaram a captação celular após aplicação de campo magnético externo. Tanto a análise por microscopia confocal quanto por qRT-PCR demonstraram que as nanopartículas foram eficientes carreadores de siRNA além de serem capazes de promover o escape endossomal. Diante dos dados obtidos, as IO-*caf*@CaP/siHER2/PEG-PAsp apresentaram-se como sistemas promissores para a entrega de siRNA na terapia de RNAi possuindo tamanho, forma e carga superficial adequados para aplicação biomédica. Além do mais, as nanopartículas mostraram-se eficientes em carrear o siRNA à célula alvo e promover o silenciamento do gene HER-2 em linhagem celular de câncer de mama HER-2 positivo.

Palavras chave: RNA de interferência, siRNA, nanopartículas magnéticas, câncer de mama HER-2 positivo

ABSTRACT

Breast cancer is the second most diagnosed cancer in the world and is the leading cause of death among women. Approximately 20% of cases presents overexpression of HER-2 protein, which has been associated with highly aggressive disease, increased metastatic potential, recurrence and poor survival. However, several mechanisms of resistance to conventional therapies are being described, and then new and more effective therapies are urgently needed. In this context, the interference effect by RNAi pathway presents itself as an attractive strategy to block proteins expression by sequence-specific RNA interference. Thus, this study aimed to develop, characterize and apply a new nanocarrier system for siRNA anticancer therapy. After addition of caffeic acid coating on iron oxide nanoparticles the system formed by a magnetic core coated with inorganic salts, siRNA and block copolymer, IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp, was synthesized and characterized. The transmission electron microscopy (TEM) images revealed spherical nanoparticles and the dynamic light scattering (DLS) measurements showed averaged hydrodynamic diameter in the intensity histogram of 134.70 nm and polydispersity index of 0.163. The formulation has the surface charge equal to -3.06 and concentration of $6,49 \times 10^{12}$ particles/mL determined by nanoparticle tracking analysis (NTA). The particles seemed to be stable even after 42 days of storage, and after lyophilization. The siRNA incorporation rate ranged from 87 to 99%. According to the cytotoxicity by MTT studies, the IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp are not toxic to the cell line HCC1954 and the magnetic field increased their cellular uptake. Both the analysis, confocal microscopy and the qRT-PCR assay demonstrated that the nanoparticles were effective nanocarriers of siHER2 and were able to promote endosomal escape. In this context, the nanoparticles IO-caf@CaP/HER2/PEG-PAsp presented themselves as promising carrier systems for siRNA delivery, for RNA interference therapy, having size, shape and surface charge suitable for biomedical applications. Furthermore, the nanoparticles were shown to be efficient in carrying the siRNA to the target cell and promote silencing of the HER-2 gene in HER-2 positive breast cancer cell line.

Keywords: Interfering RNA, siRNA, magnetic nanoparticles, HER-2 positive breast cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dimerização e vias de sinalização intracelular da família HER	28
Figura 2: Formas variantes da proteína HER-2	30
Figura 3: Mecanismo de ação do siRNA na terapia por RNA de interferência.	34
Figura 4: Possíveis sistemas de entrega do tipo viral e não viral	38
Figura 5: Mecanismos de acúmulo de spions no tecido tumoral.....	39
Figura 6: Escape endossomal de nanopartículas	41
Figura 7: Estrutura química do PEG-PAsp	42
Figura 8: Caracterização da morfologia e tamanho médio das IO-caf.63	
Figura 9: Caracterização da carga superficial das nanopartículas de óxido de ferro (IO-NP) e núcleos revestidos com ácido cafeico (IO-caf).	64
Figura 10: Caracterização de tamanho e forma das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp.	68
Figura 11: Espectro de fotoemissão de filmes de IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp obtido por XPS.....	71
Figura 12: Avaliação da eficiência de incorporação de siRNA às IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp.....	72
Figura 13: Avaliação da estabilidade coloidal das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp por DLS.	74
Figura 14: Liofilização das IO-caf@CaP/PEG-PAsp (Mock).	75
Figura 15: Estudo de responsividade ao campo magnético das IO-caf@CaP/PEG-PAsp.	76
Figura 16: Avaliação da citotoxicidade na suspensão de IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp e dos componentes utilizados para a síntese.....	77
Figura 17: Avaliação da estabilidade coloidal das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp após ultrafiltração.	79
Figura 18: Avaliação da citotoxicidade das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp na linhagem celular HCC1954.	80
Figura 19: Avaliação da proliferação celular por MTT na linhagem células HCC1954 após 96 horas de incubação.	81
Figura 20: Método de ferrozine para quantificação de ferro intracelular na linhagem celular HCC1954.....	83
Figura 21: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da linhagem HCC1954 incubadas com as IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp.....	84
Figura 22: Análise da captação celular das IO-Caf@CaP/siCy5/PEG-PAsp por microscopia confocal.	86

Figura 23: Expressão do gene HER-2 na linhagem celular HCC1954 após tratamento com IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp..... 88

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Esquema representativo das barreiras enfrentadas pela molécula de siRNA após aplicação intravenosa	38
Esquema 2: Esquema ilustrativo do processo de síntese das nanopartículas IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp.....	50
Esquema 3: Esquema ilustrativo do dispositivo utilizado para o estudo de responsividade ao campo magnético.....	54
Esquema 4: Esquema ilustrativo sugerido ao núcleo formado pelas nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido cafeico (IO-caf).....	67
Esquema 5: Esquema ilustrativo sugerido às nanopartículas IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos iniciadores utilizados na qRT-PCR	59
Tabela 2: Sequências do siRNA utilizada	61
Tabela 3: Dados referentes às IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp sintetizadas com diferentes concentrações de bloco de copolímero PEG-PAsp.....	67
Tabela 4: Valores de tamanho médio obtidos por diferentes técnicas para a IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

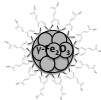
AGO2	Argonauta 2
ANOVA	Análise de variância
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BSA	Albumina sérica bovina
CAF	Ácido cafeico
cDNA	DNA complementar
CuSO₄	Sulfato de cobre (II)
DLS	Espalhamento de luz dinâmico, do inglês, <i>Dynamic light scattering</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da media
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentados
Fe₃O₄	Magnetita
FeCl₂	Cloreto de ferro (II)
FeCl₃	Cloreto de ferro (III)
HCC1954	Linhagem celular humana de carcinoma ductal de mama
He-Ne	Hélio-Neônio
HER-2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano, <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IO-Caf	Nanopartículas de óxido de ferro revestida com ácido cafeico
IO-Caf/PEG-PAsp	Mock – Nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido cafeico e recobertas com fosfato de cálcio e bloco de copolímero
IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp	Nanopartículas de óxido de ferro revestida com ácido cafeico e recobertas com fosfato de cálcio e bloco de copolímero contendo siHER2
IO-NP	Nanopartículas de óxido de ferro
LCME	Laboratório central de microscopia eletrônica
Mock	Nanopartícula sem siRNA
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MTT	Brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio

MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
N35	Ímã de neodímio 35 gauss
NP	Nanopartícula
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas, do inglês <i>Nanoparticle tracking analysis</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PdI	Índice de polidispersão
PEG-PAsp	Bloco de copolímero poli(etileno glicol)-bloco-poli aspartato
PES	Membrana de polietersulfona
RISC	Complexo de indução de silenciamento de RNA, <i>RNA-induced silencing complex</i>
RPMI	Meio de cultura criado por Roswell Park memorial institute
SFB	Soro fetal bovino
siCy5	<i>Small interfering RNA</i> marcado com cianina 5
siHER2	<i>Small interfering RNA</i> específico para o gene HER-2
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
siRNA Naked	siRNA livre, não incorporado à nanopartícula
Spions	Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas
TAE	Tris-acetato-EDTA
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
XPS	Espectroscopia de emissão de fotoelétrons Excitados por raios X
γ-Fe₂O₃	Maguemita

LISTA DE SÍMBOLOS



IO-NP - Nanopartícula de Óxido de Ferro



IO-Caf - Nanopartícula de Óxido de Ferro revestida com Ácido Cafeico



Íon de Cálcio (Ca^{+2})



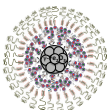
Íon de Fosfato (PO_4^{-3})



Molécula de siRNA



Molécula de PEG-PAsp



IO-Caf@CaP/HER2/PEG-PAsp

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 CÂNCER DE MAMA	25
2.1.1 Família HER	27
2.1.2 Proteína HER-2	28
2.1.3 Câncer de mama HER-2 positivo	31
2.2 TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA.....	32
2.2.1 Terapia por RNA de interferência no tratamento do câncer	35
2.2.2 Dificuldades para aplicação da terapia de RNAi	36
2.3 SISTEMAS DE ENTREGA	37
2.3.1 Acúmulo passivo e ativo.....	38
2.3.2 Nanopartículas de óxido de ferro	39
2.3.3 Fosfato de cálcio (CaP).....	40
2.3.4 Bloco de copolímero poli (etileno glicol)-bloco-poli aspartato [PEG-PAsp]	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 MATERIAIS.....	45
4.2 CONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE siRNA	45
4.3 SÍNTESE DO NÚCLEO DE ÓXIDO DE FERRO	46
4.3.1 Síntese das nanopartícula de óxido de ferro	46
4.3.2 Revestimento das IO-NP com ácido cafeico	46
4.4 MONTAGEM DO SISTEMA CARREADOR DE siRNA.....	47
4.5 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS	48
4.5.1 Avaliação morfológica das nanopartículas	48
4.5.2 Determinação do tamanho da partícula e índice de polidispersão	49
4.5.3 Determinação da carga superficial.....	49
4.5.4 Determinação do ponto isoeletrico	49
4.5.5 Determinação do tamanho da partícula e concentração: análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).....	49
4.5.6 Análise de composição elementar das IO-Caf@CaP/-siHER2/PEG-PAsp.....	50
4.5.7 Determinação da eficiência de incorporação de siRNA no sistema carreador	50
4.5.7.1 <i>Quant-iT™ microRNA Assay Kit</i>	51
4.5.7.2 <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	51

4.5.8 Estudo de estabilidade coloidal	51
4.5.9 Análise de estabilidade do sistema nanocarreador após liofilização	51
4.5.10 Estudo de responsividade ao campo magnético das IO-Caf@CaP/PEG-PAsp	52
4.5.10.1 Quantificação de Ferro	53
4.5.11 Purificação das nanopartículas	53
4.6 INTERAÇÕES NA INTERFACE CÉLULA-NANOPARTÍCULAS	54
4.6.1 Cultura Celular	54
4.6.2 Citotoxicidade das IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp	54
4.6.3 Captação celular das IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp	55
4.6.3.1 Quantificação do ferro intracelular.....	55
4.6.3.1.1 Dosagem de Proteínas Totais	55
4.6.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	56
4.6.3.3 Microscopia de fluorescência confocal	56
4.6.4 Silenciamento gênico mediado por RNA de interferência	57
4.6.4.1 Modulação dos níveis de mRNA por qRT-PCR	58
4.6.4.1.1 Extração de RNA.....	58
4.6.4.1.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)	58
4.6.4.1.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (qRT-PCR).....	58
4.7 Análise estatística:	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 CONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE siRNA.....	61
5.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO NÚCLEO DE ÓXIDO DE FERRO	61
5.3. MONTAGEM DO SISTEMA NANOCARREADOR IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp	65
5.4. ANÁLISES <i>IN VITRO</i> - INTERAÇÕES NA INTERFACE CÉLULAS - IO-CAF@CAP/siHER2/PEG-PAsp.....	79
5.4.1 Captação celular das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp	82
5.4.2 Silenciamento gênico mediado por RNA de interferência	87
6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS	89
7. CONCLUSÕES.....	91
8. PERSPECTIVAS.....	93
REFERÊNCIAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

Entre os diversos tipos de câncer, o câncer de mama é o segundo mais diagnosticado no mundo (1,7 milhões, 11,9%), representando a principal causa de morte do sexo feminino (DESANTIS *et al.*, 2015). De acordo com a Organização Mundial da Saúde até o ano de 2030 são esperadas mais de 800 mil mortes decorrentes do câncer de mama no mundo (WHO, 2015). O alto índice de mortalidade está diretamente relacionado ao diagnóstico tardio, já que a doença apresenta-se em estágios avançados (WHO, 2016).

Aproximadamente 20% dos casos de câncer de mama apresentam o subtipo HER-2 e caracterizam-se pela superexpressão da proteína tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (STENEHJEM *et al.*, 2014; WITTON *et al.*, 2003). Após dimerização e ativação da proteína transmembrana HER-2 ocorre a sinalização intracelular resultando no estímulo da proliferação, sobrevida, diferenciação, angiogênese e invasão celular. Desta forma, a amplificação anormal do gene HER-2 proporciona uma doença com pior prognóstico, uma vez que o tumor torna-se agressivo, com alto poder metastático, recidiva e baixa sobrevida (AHMAD, 2013; IQBAL; IQBAL, 2014; MARTIN; SMITH; TOMLINSON, 2014).

Tumores mamários representam uma doença complexa, que podem apresentar histologia e clínica semelhantes, porém diferentes prognósticos e respostas terapêuticas (CIRQUEIRA *et al.*, 2011). Desta maneira, o tratamento é frequentemente realizado com mais de uma abordagem terapêutica, as quais estão intimamente relacionadas com o tipo de câncer e progressão do tumor (MARTIN; SMITH; TOMLINSON, 2014).

Entretanto, os tratamentos convencionais não atingem somente as células tumorais, mas também os tecidos saudáveis apresentando uma série de efeitos adversos que podem levar a complicações severas. Além disso, aproximadamente 15% dos pacientes apresentam recidiva após as terapias antitumorais convencionais indicando a presença de resistência (NAHTA; ESTEVA, 2006). Neste contexto, constata-se a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para superar a resistência e melhorar o prognóstico dos pacientes.

Nesse sentido, a terapia por RNA de interferência (RNAi) tem surgido como alternativa eficiente para o tratamento do câncer de mama HER-2 positivo. O efeito de RNAi é um processo potente e versátil, capaz de inibir a produção de proteínas gene específico (GAO; HUANG, 2013). A aplicação desta estratégia na terapia ocorre por meio

da inserção de moléculas sintéticas de siRNA (*small interfering RNA*) no citoplasma celular. Estas são incorporadas ao complexo RISC (complexo de indução de silenciamento de RNA) a fim de promover a busca e clivagem do mRNA alvo, impedindo a produção da proteína por ele codificada (ZHOU; ZHANG; LIANG, 2014).

Porém, para que o efeito RNAi seja efetivo, este pequeno ácido nucleico deve chegar ao citoplasma celular de maneira segura. Desta forma, a utilização de sistemas de entrega controlada mostram-se como uma estratégia capaz de superar as diversas barreiras biológicas e intrínsecas à molécula de siRNA (DOMINSKA; DYKXHOORN, 2010; KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012).

Nanopartículas superparamagnéticas (spions) destacam-se sobre os diversos sistemas de entrega existentes principalmente por apresentarem alta biocompatibilidade, possibilidade de síntese sem a utilização de solventes orgânicos, além de serem facilmente guiadas ao local de ação após aplicação de campo magnético externo (COLE *et al.*, 2011; GUPTA, AJAY KUMAR, 2005; ROCA *et al.*, 2009). Atualmente são amplamente estudadas e utilizadas na área biomédica devido a grande gama de aplicações, as quais destacam-se a captura de imagens por ressonância magnética (MRI), a separação magnética e a terapia por hipertermia (BASEL *et al.*, 2012; CHA *et al.*, 2011; LAURENT *et al.*, 2014).

Contudo, devido às desordens magnéticas, oxidação descontrolada e manutenção do tamanho e forma, a adição de camadas de revestimento às spions faz-se necessária (MYKHAYLYK *et al.*, 2007). Desta forma, com o presente trabalho pretende-se desenvolver e caracterizar uma formulação de nanopartículas com propriedades magnéticas para o carregamento ativo de siRNA. Adicionalmente, pretende-se aplicar a formulação *in vitro*, em linhagem celular de câncer de mama HER-2 positivo, a fim de avaliar o efeito da terapia por RNA de interferência.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

Estudos estatísticos e epidemiológicos indicam que o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais diagnosticado no mundo (1,7 milhões de casos, 11,9%) representando a principal causa de morte entre as mulheres (25%) (DESANTIS *et al.*, 2015; FERLAY *et al.*, 2014; WHO, 2012). Com relação ao Brasil, dos 596.070 mil novos casos esperados para 2016, aproximadamente 58 mil serão de câncer de mama (INCA, 2015). A doença representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina com 12,7 óbitos para cada 100.000 mulheres. Quando analisado por região, as regiões Sul e Sudeste são as que apresentam as maiores taxas de mortalidade (INCA, 2016e).

O câncer de mama corresponde a uma doença heterogênea com diferentes morfologias, perfis moleculares, comportamentos clínicos e respostas terapêuticas (EROLE *et al.*, 2012). Diversos fatores podem promover a transformação de células normais em células tumorais. Entre os fatores de risco para o câncer de mama, destaca-se a idade, fatores endócrinos/história reprodutiva (relacionados principalmente ao estímulo estrogênico tanto endógeno quanto exógeno), ambientais/comportamentais (ingestão de bebidas alcoólicas, sobrepeso, tabagismo, exposição à radiação ionizante) e genéticos/hereditários (presença de mutações em determinados genes, especialmente BRCA1 e BRCA2). É possível afirmar que a idade representa o principal fator de risco, uma vez que o acúmulo de exposições ao longo da vida além das próprias alterações biológicas aumentem o risco para o desenvolvimento de câncer de mama (ACS, 2016c; INCA, 2016b; MENDES; HELENA, 2005).

Embora não se conheça todas as formas que evitam o câncer de mama, existem medidas que podem ser tomadas a fim de diminuir os riscos do desenvolvimento da doença, como: manter o peso e a alimentação saudáveis, praticar exercícios regularmente, evitar o consumo de bebidas alcoólicas, fazer reposição hormonal somente se necessário e com acompanhamento médico (MAY; FELICITY; MAY, 2014). Estudos apontam que 30% dos casos podem ser evitados apenas cumprindo as três primeiras medidas citadas anteriormente (INCA, 2016e).

A próxima estratégia a ser seguida é o diagnóstico precoce, uma vez que descoberto nos estágios iniciais, o tratamento torna-se mais efetivo (MAY; FELICITY; MAY, 2014). Existem alguns sinais de alerta que auxiliam e direcionam o diagnóstico precoce tais como o

surgimento de nódulos na mama ou nas axilas, alterações na pele, forma ou tamanho do mamilo ou da mama, secreção no mamilo e dor em qualquer região da mama (ACS, 2015; INCA, 2016c). São recomendados também o exame clínico e o autoexame das mamas. O diagnóstico de confirmação é realizado de diferentes maneiras, como mamografia, ultrassonografia e ressonância magnética por imagem (ACS, 2016a; CDC, 2014). A mamografia (radiografia da mama) permite a detecção de lesões na fase inicial, medindo milímetros. Esta deve ser realizada, a cada dois anos, por mulheres entre 50 e 69 anos ou segundo recomendação médica. Quando observada a presença de nódulos a biópsia é realizada para determinar a malignidade do tumor e direcionar para o tratamento mais adequado (INCA, 2016a).

Atualmente, o tratamento do câncer de mama varia de acordo com o local, as características biológicas do tumor e as condições do paciente. De maneira geral, existem duas modalidades de tratamento a serem seguidas: a local, que compreende a cirurgia e a radioterapia, ou a sistêmica, que consiste na quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica (INCA, 2016d).

Tumores mamários representam uma doença complexa, com diferentes características clínicas, morfológicas e biológicas. Os tumores podem apresentar histologia e clínica semelhantes, porém diferentes prognósticos e respostas terapêuticas (CIRQUEIRA *et al.*, 2011). Desta forma, o tratamento contra o câncer de mama é frequentemente realizado com mais de uma abordagem terapêutica, a qual está intimamente relacionada com o tipo de câncer e progressão do tumor (MARTIN; SMITH; TOMLINSON, 2014).

O câncer de mama pode ser classificado de acordo com a origem da célula tumoral, podendo ser do tipo carcinoma, quando inicia em células epiteliais, adenocarcinoma, quando inicia no tecido glandular, ou sarcomas, quando iniciam em células do músculo, gordura ou tecido conjuntivo (ACS, 2016b).

Particularmente, cânceres do tipo carcinoma são divididos em quatro tipos básicos, os quais diferenciam-se pela expressão de receptores hormonais de estrogênio (ER) e progesterona (PR), receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) ou pela ausência deles, sendo então considerados triplamente negativos. Além desta classificação, o câncer de mama pode ser subdividido em: Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2, e basalóide (AHMAD, 2013; CIRQUEIRA *et al.*, 2011; CURTIS *et al.*, 2012; GUIU *et al.*, 2012). Conhecer a classificação é fundamental para o sucesso da terapia, para

que esta seja personalizada e adaptada às necessidades individuais dos pacientes (MARTIN; SMITH; TOMLINSON, 2014).

2.1.1 Família HER

Os receptores da família HER (HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4), também chamados EGF/ErbB, são proteínas transmembrana do tipo tirosina-cinase que se ligam ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e a outras moléculas semelhantes. Desempenham um papel central no desenvolvimento de diversos tipos de câncer (BERCHUCK *et al.*, 1990; YARDEN, 2001). Agem principalmente sobre o crescimento, diferenciação e sobrevivência celular, além de estarem envolvidos com diversas vias de sinalização intracelulares relacionadas com a proliferação e diferenciação celular de diversos órgãos e sistemas (FREITAS, 2008; IQBAL; IQBAL, 2014; TAI; MAHATO; CHENG, 2010).

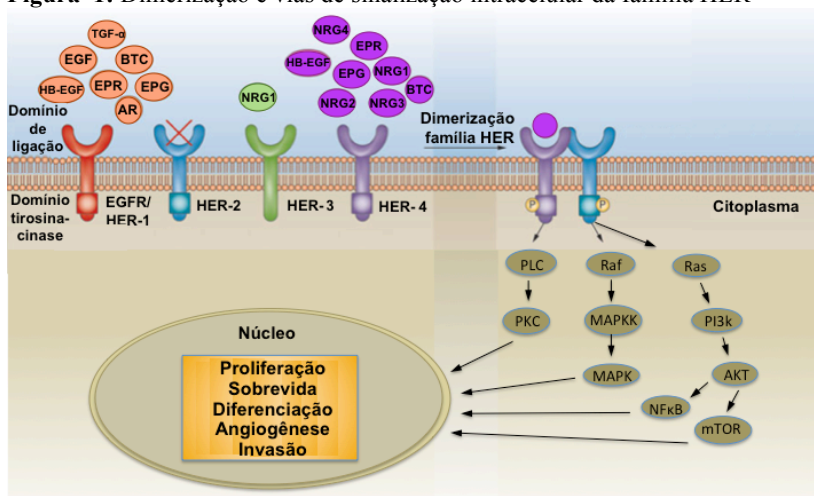
Do ponto de vista histórico, o gene *neu* foi primeiramente identificado em tumores neurais de ratos (SHIH *et al.*, 1981) tendo sido descrito em humanos (*HER/neu*) três anos depois (SCHECHTER *et al.*, 1984). Este gene está localizado no cromossomo 17 (17q12), codifica uma proteína transmembrana que apresenta estrutura bastante parecida com um receptor de fator de crescimento epidérmico humano e por esta razão foi denominada de HER-2, *Human Epidermal Receptor* (JACKSON *et al.*, 2013; RUBIN; YARDEN, 2001).

Na família HER, a ativação da atividade tirosina-cinase acontece após a interação de um ligante específico com posterior mudança conformacional e, então, dimerização das proteínas (DONOVAN, 2012; JACKSON *et al.*, 2013; O'BRIEN *et al.*, 2010). Tal dimerização pode ocorrer com o mesmo tipo de receptor, formando um homodímero, ou com outro membro da família, resultando em um heterodímero (CITRI; YARDEN, 2006).

A dimerização é fundamental para a sinalização intracelular. Inclusive, quando esta ocorre através de heterodímeros, a resposta normalmente é mais potente do que aquela estimulada por homodímeros (CITRI; YARDEN, 2006). A proteína HER-2 não é capaz de formar homodímeros (GARRETT *et al.*, 2003), entretanto é considerada o par perfeito para formar heterodímeros, além de ser a única que não necessita de um ligante extracelular para ser ativada (DONOVAN, 2012; FREITAS, 2008). Além disso, a formação de heterodímeros com HER-2 aumenta a afinidade de todos os outros membros e seus respectivos ligantes (JONES; AKITA; SLIWKOWSKI, 1999).

A dimerização dos receptores HER causa a autofosforilação do resíduo tirosina-quinase a qual ativa diferentes vias de sinalização intracelular, principalmente a MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno), PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase), e PKC (proteína cinase C), resultando no estímulo da proliferação, sobrevivência, diferenciação, angiogênese e invasão celular (Figura 1) (ARTEAGA *et al.*, 2011; IQBAL; IQBAL, 2014; JACKSON *et al.*, 2013; TAI; MAHATO; CHENG, 2010).

Figura 1: Dimerização e vias de sinalização intracelular da família HER



Os membros da família HER após interação com ligante extracelular formam dímeros e ativam vias de sinalização intracelular relacionadas a proliferação, sobrevivência, diferenciação, angiogênese e invasão celular. Abreviações: EGF, Fatores de crescimento epidermal; AR, Anfiregulina; BTC, Betacelulina; EPR, Epiregulina; TGF- α , Fator de transformação de crescimento; HB-EGF, Fator de crescimento epidérmico de ligação de heparina; NRG, Neuregulina; PLC, Fosfolipase C; PKC, Proteína cinase C; PI3K, Fosfatidilinositol-3-cinase; MAPK, Proteína cinase ativada por mitógeno, AkT, Proteína cinase B; mTOR, rapamicina em mamíferos; NF κ B, Fator nuclear kappa B. Adaptado de ARTEAGA *et al.*, 2011 e IQBAL; IQBAL, 2014.

2.1.2 Proteína HER-2

A presença do gene HER-2 superexpresso em um tumor apresenta importante papel no desenvolvimento, progressão e capacidade de metástase, além de proporcionar um pior prognóstico de diferentes tipos de câncer, como o de mama (DENT *et al.*, 2013), ovário

(CHAO *et al.*, 2014), cólon (LIU, B *et al.*, 2000), pulmão (KERN *et al.*, 1992) e gástrico (GRAVALOS; JIMENO, 2008).

Células não tumorais habitualmente apresentam poucas cópias do gene HER-2, o que resulta em uma quantidade adequada de proteína HER-2 na superfície celular (MEDSCAPE, 2016). A ativação oncogênica do HER-2 ocorre principalmente por meio de amplificação do gene, o que leva à maior expressão da proteína na membrana celular e subsequente sinalização intracelular anormal (LEE *et al.*, 2013). A expressão do HER-2 ocorre em diversos tecidos adultos, cuja superativação está relacionada a um pior prognóstico para diversos tipos de tumores (FREITAS, 2008; HYNES; STERN, 1994). O conhecimento da estrutura do receptor HER-2 é fundamental para o desenvolvimento de novos tratamentos.

O receptor HER-2 é composto de um domínio extracelular formado por dois pontos ricos em leucina (I/L1 e III/L2), responsáveis pela ligação do ligante, e dois pontos ricos em cisteína (II/CR1 e IV/CR2), sendo ambos fundamentais à dimerização. Apresenta também um domínio transmembrana e outro intracelular do tipo tirosina-cinase (WANG *et al.*, 2013).

Estudos recentes descreveram a existência de formas variantes do receptor HER-2 (VENABLES *et al.*, 2008; WARD; COOPER, 2010). As formas variantes podem apresentar tanto características que diminuem a malignidade do tumor quanto vantagens de sobrevivência celular relacionadas a resistência aos tratamentos (KLINCK *et al.*, 2008; VENABLES, 2004). Três formas naturais presentes no câncer de mama foram descritas: Δ 16HER-2, herstatin e p100 (JACKSON *et al.*, 2013).

A proteína variante Δ 16HER-2 apresenta uma mudança conformacional devido a perda de um resíduo de cisteína do domínio extracelular, consequentemente a homodimerização ocorre por uma ligação covalente do tipo dissulfeto (CASTIGLIONI *et al.*, 2006; MARCHINI *et al.*, 2011). Além disso, foi descrita a expressão desta variante em 89% dos pacientes que apresentaram progressão do tumor da mama para os nódulos linfáticos (MITRA *et al.*, 2009). Esse achado vai de encontro com a pesquisa que sugere que proteína Δ 16HER-2 parece ter perfil invasivo, necessitando de intervenções terapêuticas mais agressivas (JACKSON *et al.*, 2013).

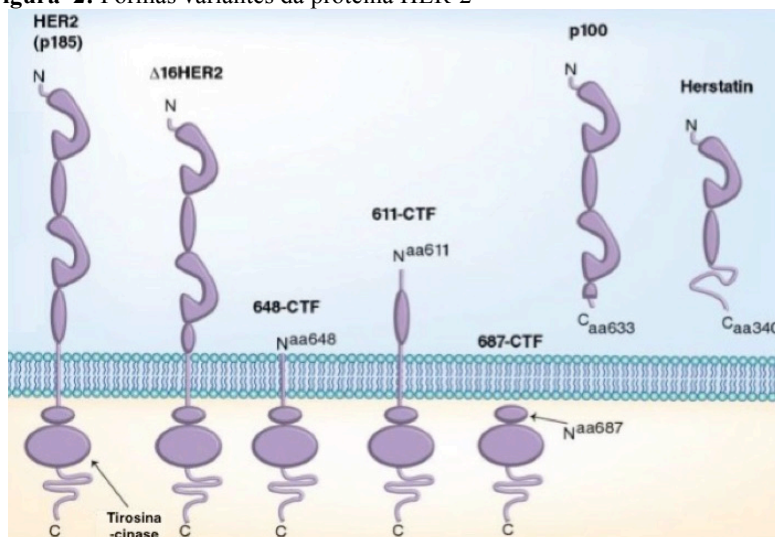
Em 1993 foi descrita pela primeira vez a variante p100, a qual apresenta-se solúvel e possui apenas um domínio extracelular de 100 kDa (SCOTT *et al.*, 1993). Destaca-se por apresentar características antioncogênicas, uma vez que estudos *in vitro* demonstraram que a dimerização com a proteína HER-2 inibe a proliferação celular de

tumores gástricos e de mama (AIGNER *et al.*, 2001). Da maneira semelhante, foram observados níveis mais baixos de p100 em pacientes com tumores mais agressivos (LENNON *et al.*, 2009).

Herstatin também é uma variante solúvel, formada apenas pelo domínio extracelular. Evidências apontam que esta proteína também pode inibir o crescimento celular de células HER-2 positivas, uma vez que apresenta a capacidade de interferir na dimerização e diminuir a fosforilação do domínio tirosina-cinase (JUSTMAN; CLINTON, 2002). Desta forma, assim como a p100, a herstatin possui uma atividade protetora (antioncogênica) o que corrobora com estudos nos quais foram relatados níveis aumentados, de ambas as proteínas, em tecidos não tumorais quando comparados com os tumorais (KOLETSA *et al.*, 2008).

De forma complementar, foram descritas outras 3 formas variantes da proteína HER-2; todas apresentam um fragmento carboxi terminal de maneira comum, porém a proteína 687-CTF é inativa por não possuir os domínios transmembrana e extracelular, enquanto que os fragmentos 648-CTF e 611-CTF são capazes de ativar diversas vias de sinalização intracelular (WANG *et al.*, 2013).

Figura 2: Formas variantes da proteína HER-2



As formas variantes da proteína HER-2 incluem o $\Delta 16\text{HER2}$, a 648-CTF, 611-CTF, 687-CTF e assim como a p100 e herstatin (duas formas solúveis). As variantes solúveis podem interagir com os demais receptores e inibir a dimerização; 687-CTF está inativo; 648-CTF e 611-CTF podem ativar várias vias de transdução de sinal intracelular; e $\Delta 16\text{HER2}$ apresenta uma alteração

conformacional que promove a formação de homodímeros HER-2 constitutivamente ativado. Abreviações: CTF: Fragmento carboxi-terminal; HER2: Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano. Adaptado de (WANG *et al.*, 2013)

2.1.3 Câncer de mama HER-2 positivo

Aproximadamente 20% dos casos de câncer de mama apresentam o subtipo HER-2 e caracterizam-se pela superexpressão da proteína tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano - HER-2 (STENEHJEM *et al.*, 2014; WITTON *et al.*, 2003). A amplificação anormal do gene HER-2 proporciona maior sinalização intracelular sobre estímulos de proliferação, sobrevivência, diferenciação, angiogênese e invasão celular. Desta forma, a doença apresentará pior prognóstico, uma vez que o tumor será bastante agressivo, com alto poder metastático, recidiva e baixa sobrevivência (AHMAD, 2013; IQBAL, 2013; IQBAL, 2014; MARTIN; SMITH; TOMLINSON, 2014).

A superexpressão do receptor HER-2 transformou a proteína em um potente alvo para a terapia anticâncer. Em 1998, foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) o Trastuzumab (Herceptin® - Genentech), o primeiro anticorpo humanizado direcionado à proteína HER-2, o qual tem a capacidade de ligar-se à superfície das células tumorais, induzir a internalização do receptor e inibir o ciclo celular (TAI; MAHATO; CHENG, 2010).

Outros medicamento também direcionados à proteína HER-2 foram desenvolvidos, como o Lapatinib (Tyverb® - GlaxoSmithKline) que atua como um inibidor do receptor da tirosina-cinase no domínio intracelular de HER-1 e HER-2 (LEIVONEN *et al.*, 2014); o Pertuzumabe (Perjeta®/Omnitarg® - Genentech) um anticorpo monoclonal que inativa o receptor HER-2 e impede a sinalização intracelular (CHUMSRI, 2015); o Trastuzumabe emtansine/T-DM1 (Kadcyla®) que resulta da conjugação do Trastuzumabe com a Entansina (DM1), fármaco inibidor de uma proteína fundamental para a multiplicação celular (LORUSSO *et al.*, 2011); o Neratinib (HKI-272® - Pfizer) que atua como inibidor do receptor de tirosina-cinase do HER-1, HER-2 e HER-4 (NAHTA, 2012); e o HER-2-Affitoxin que resulta da combinação de uma pequena proteína específica para o HER-2 (HER-2 *Affibody*) com uma exotoxina A (PE 38) modificada de *Pseudomonas aeruginosa* (ZIELINSKI *et al.*, 2011).

Entretanto, os tratamentos convencionais não atingem somente as células tumorais, mas também os tecidos saudáveis apresentando uma série de efeitos adversos que podem levar a complicações severas. Além

disso, aproximadamente 15% dos pacientes apresentam recidiva após a terapia antitumoral, indicando a presença de resistência (NAHTA; ESTEVA, 2006). Das mulheres que foram tratadas com trastuzumab, o tempo médio para adquirir resistência, seja parcial ou completa, é de menos de 1 ano (NAHTA, 2012). Neste sentido, diversos mecanismos de resistência já foram propostos incluindo (a) alteração da interação receptor-anticorpo, (b) sinalização intracelular por outros membros da família HER ou outros receptores e (c) ativação constante das vias de sinalização (ARTEAGA *et al.*, 2011; KÜMLER; TUXEN; NIELSEN, 2014).

Durante o processo de desenvolvimento do câncer, as células adquirem diversas mutações que acabam contribuindo à malignidade da doença (LEIVONEN *et al.*, 2014). Desta forma, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para superar a resistência visando a melhora do prognóstico dos pacientes, é necessário.

2.2 TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA

O efeito de RNA de interferência consiste em um processo natural que ocorre nas células eucariontes como forma de controle gene específico (FORD; TOLOUE, 2010). Consiste no bloqueio da expressão de proteínas, uma vez que o RNA mensageiro (mRNA) alvo é degradado, devido à ação de moléculas longas de RNA de fita dupla (dsRNA) (GAO; HUANG, 2013).

A aplicação do RNA de interferência (RNAi) foi descrito pela primeira vez em 1998, quando Craig Mello e Andrew Fire observaram a interferência de maneira sequência-específica após a introdução de uma dupla fita de RNA exógeno em nematódeos do gênero *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al.*, 1998). Posteriormente, foi demonstrado *in vitro* o silenciamento de genes em células de mamíferos utilizando sequências curtas e sintéticas de RNA, moléculas chamadas de *small interfering RNA* (siRNA) (ELBASHIR *et al.*, 2001). No ano seguinte, esse mecanismo foi utilizado com sucesso *in vivo*, em que ratos com hepatite C apresentaram o silenciamento gênico após tratamento específico (MCCAFFREY *et al.*, 2002). A partir de então, essa estratégia ganhou destaque na pesquisa como potente forma de tratamento de diversas doenças (DYKXHOORN; LIEBERMAN, 2005; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; ZHOU; ZHANG; LIANG, 2014).

O mecanismo endógeno de RNAi contribui significativamente à regulação e expressão de genes. Assim, foram identificadas 4 moléculas como agentes efetores: siRNAs, microRNAs (miRNAs), piwi-interacting RNAs (piRNAs) e RNA longo não codificante (linRNAs)

(GHILDIYAL; ZAMORE, 2009). Os piRNAs atuam, principalmente, sobre o silenciamento de genes de transcrição e na defesa de mecanismos epigenéticos transgeracionais (LUTEIJN; KETTING, 2013), enquanto que os miRNA e siRNA são os grandes responsáveis pelo silenciamento gênico (CONDE *et al.*, 2015).

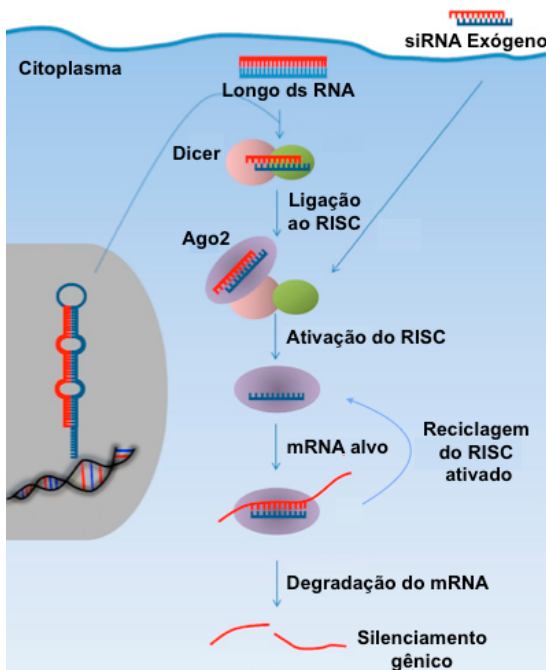
Em células de mamíferos, o siRNA é gerado pela clivagem feita pela enzima Dicer de longas fitas duplas de RNA, em estruturas menores, contendo de 21 a 23 nucleotídeos de comprimento e 2 nucleotídeos não pareados na porção 3' terminal (PATIL; RHODES; BURGESS, 2005). Visando a terapia na prática, a inserção da fita de siRNA sintética permite evitar a ação mecânica da Dicer, o que poderia impactar nos mecanismos endógenos celulares (MANJUNATH; DYKXHOORN, 2010; PATIL; RHODES; BURGESS, 2005) e reduzir a resposta do sistema imune inato (GRIMM *et al.*, 2006). O siRNA uma vez no citoplasma celular é incorporado ao complexo de silenciamento proteico chamado RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), o qual possui a enzima Argonauta 2 (ARGO 2), responsável por clivar a fita sense do siRNA. O complexo RISC ativado, utiliza a fita antisense como guia para selecionar a sequência complementar ao mRNA presente no citoplasma. O silenciamento ocorrerá devido à degradação do mRNA, impedindo a produção da proteína por ele codificada (AMERES; MARTINEZ; SCHROEDER, 2007; DYKXHOORN; LIEBERMAN, 2005; OH; PARK, 2009). Em seguida, o complexo RISC é reciclado e continua a procurar por mRNAs alvo, o que propaga o efeito de interferência (Figura 3)(WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; ZHOU; ZHANG; LIANG, 2014).

A capacidade de reciclar-se e continuar a degradar mRNAs alvo garante um efeito terapêutico de 3 – 7 dias em células com rápida e constante divisão e até algumas semanas em células mais lentas quando avaliadas *in vitro* (BARTLETT; DAVIS, 2006). Contudo, aplicações constantes promovem um efeito de silenciamento mais duradouro sem interferir no mecanismo endógeno dos microRNAs (JOHN *et al.*, 2007).

O grande potencial terapêutico do efeito de interferência está no tratamento de doenças em que a expressão anormal de certos genes pode ser identificada como causa ou fator contribuinte (FRANÇA *et al.*, 2010) como por exemplo o câncer (GAO; HUANG, 2013), as infecções virais (DEVINCENZO *et al.*, 2010) e as doenças que apresentam distúrbios genéticos dominantes (DIFIGLIA *et al.*, 2007). De grande importância, o efeito de RNAi é transitório e não causa modificação permanente na genética do organismo caracterizando-se, desta forma,

como potencial ferramenta terapêutica que não causa danos genéticos permanentes ou mutações.

Figura 3: Mecanismo de ação do siRNA na terapia por RNA de interferência.



Molécula sintética de siRNA chega ao citoplasma celular e incorpora-se ao complexo RISC, o qual será ativado após sofrer ação da enzima argonata 2, a qual irá clivar e eliminar a fita sense do siRNA. Uma vez ativado, possuindo apenas a fita antissense, o complexo irá procurar de maneira seletiva o mRNA alvo e degradá-lo, evitando a produção da proteína por ele codificada. Adaptado de (CONDE *et al.*, 2015)

Com o avanço da biologia molecular e realização do Projeto Genoma Humano, genes patogênicos têm sido descritos e podem ser selecionados como alvos terapêuticos. Além disso, a sequência completa do genoma humano fornece todas as informações necessárias para a criação da molécula sintética de siRNA específico (ZHOU; ZHANG; LIANG, 2014).

Diferentemente das terapias convencionais com compostos, proteínas e anticorpos, os siRNAs apresentam diversas vantagens, como: alta especificidade, necessidade de pequena concentração intracelular,

baixa toxicidade e ampla gama de aplicação (JOO *et al.*, 2014). Desta forma, a terapia por RNAi mostra-se como uma ferramenta bastante interessante, correspondendo a uma nova opção terapêutica.

2.2.1 Terapia por RNA de interferência no tratamento do câncer

A terapia com o efeito de RNAi apresenta-se como uma alternativa para o tratamento do câncer de mama HER-2 positivo por possibilitar o bloqueio da produção de proteína específica. Comparando com as terapias convencionais, a identificação e desenvolvimento de siRNAs específicos são mais rápidos, necessitam de menor tempo de estudo além de ser uma terapia com maior seletividade e eficiência (VICENTINI *et al.*, 2013).

Por meio de uma entrega apropriada os siRNAs são capazes de gerar o *knocking down* do gene alvo. Desde o primeiro estudo clínico utilizando siRNA em 2010, o interesse e o desenvolvimento da terapia por RNA de interferência tem aumentado (BRUNO, 2011; DAVIS *et al.*, 2010; ESPOSITO *et al.*, 2014; KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012; XU, CONG-FEI; WANG, 2014). Existem diversos estudos pré-clínicos utilizando a estratégia terapêutica de RNAi. Como exemplo, menciona-se um carreador não viral do tipo nanotubo de carbono de parede única para a entrega segura do siRNA para o tratamento de melanoma, o qual teria como alvo a proteína BRAF (SIU *et al.*, 2014). Contra o câncer de mama, estudo avaliou o potencial de silenciamento do siRNA direcionado à glicoproteína P (Pgp) responsável pela resistência a múltiplos fármacos (YHEE *et al.*, 2015).

Com relação ao câncer de mama HER-2 positivo, estudos avaliaram o uso da terapia de RNAi com o intuito de melhorar os tratamentos convencionais (CHOUDHURY *et al.*, 2004; FALTUS *et al.*, 2004; LIANG *et al.*, 2010; TAI; MAHATO; CHENG, 2010; ZHANG, JING; LI; HUANG, 2014; ZHANG, WEIQI *et al.*, 2011). Esta avaliação pode ser feita *in vitro*, utilizando um nanocarreadore sintético contendo diferentes sequências de siRNA, as quais estão direcionadas a diferentes regiões do mRNA do gene HER-2. A transfecção pode ser dos siRNAs isolados ou combinados, a fim de avaliar tanto um efeito sinérgico quanto selecionar a sequência mais específica e eficiente. (CHOUDHURY *et al.*, 2004; FALTUS *et al.*, 2004). Por outro lado, é interessante avaliar o possível sinergismo entre diferentes genes. Estudos afirmam que 87,7% dos casos de câncer de mama HER-2 positivo estão associados a alta expressão de VEGF. Desta forma, a utilização de sequências de siRNA direcionadas a ambos os genes

podem ocasionar um silenciamento maior do que quando aplicados separadamente (TAI; QIN; CHENG, 2010).

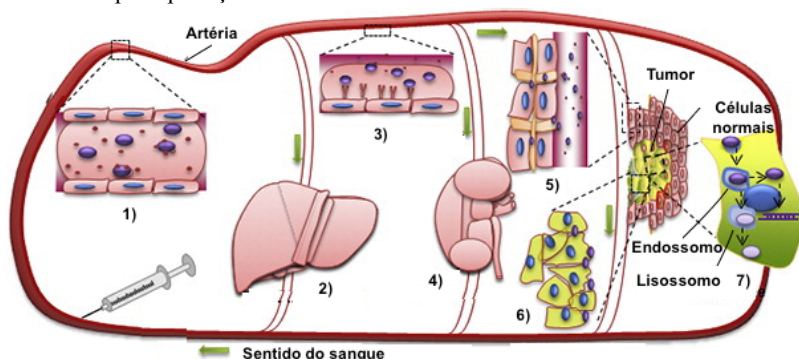
2.2.2 Dificuldades para aplicação da terapia de RNAi

Apesar das vantagens da terapia por RNA de interferência, a molécula sintética de siRNA deve superar diversas barreiras relacionadas à própria molécula, ao sistema circulatório e ao tecido alvo a fim chegar ao citoplasma celular de maneira segura (Esquema 1).

Como barreiras intrínsecas à molécula de siRNA destacam-se a carga superficial negativa, pequeno número de nucleotídeos, alto peso molecular (aproximadamente 13 kDa), natureza hidrofílica e instabilidade no plasma (com tempo médio de meia vida de apenas 30 minutos) (DOMINSKA; DYKXHOORN, 2010; KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009).

A entrega direta da molécula de siRNA não gera bons resultados devido a baixa taxa de incorporação. Além disso, uma vez na corrente sanguínea, serão facilmente degradadas por enzimas ou opsonizadas por proteínas, fato que facilita sua eliminação devido ao reconhecimento pelo sistema retículoendotelial (RES). Da mesma forma, moléculas muito pequenas são sujeitas a rápida excreção renal. O siRNA deverá também ser capaz de sair da corrente sanguínea e chegar à matriz extracelular. Entretanto, quando consegue chegar ao tecido alvo, dificilmente atravessa as membranas biológicas e, caso isso ocorra, precisa escapar da degradação endossomal (KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012; WANG *et al.*, 2010; ZHANG, JING; LI; HUANG, 2014).

Esquema 1: Esquema representativo das barreiras enfrentadas pela molécula de siRNA após aplicação intravenosa.



1) Opsonização por proteínas no plasma; 2) Eliminação pelo sistema reticuloendotelial (RES); 3) Ligação aos receptores do tipo Toll (TLR), do sistema imune; 4) Clearance renal; 5) Matriz extracelular; 6) Captação celular; 7) Escape endossomal. Adaptado de (ZHOU; ZHANG; LIANG, 2014).

2.3 SISTEMAS DE ENTREGA

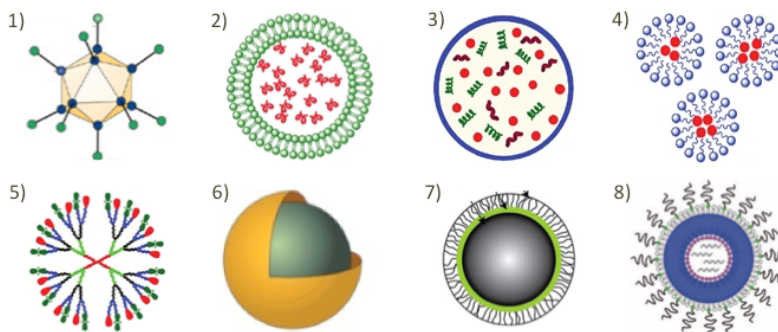
Devido aos diversos problemas para aplicação *in vivo* do siRNA livre e sem modificações, a utilização de carreadores torna-se vantajosa uma vez que proporciona a melhora principalmente das propriedades cinéticas da molécula (DOMINSKA; DYKXHOORN, 2010). Os sistemas de entrega têm o objetivo de aumentar o tempo de circulação dos siRNAs, diminuindo a taxa de filtração renal e reconhecimento pelo sistema imune, assim como proteger contra a degradação enzimática, garantir uma efetiva biodistribuição, facilitar a vetorização e captação pelas células alvo, além de promover o tráfego pelo citoplasma e ligação ao complexo RISC (REISCHL; ZIMMER, 2009; XU, CONG-FEI; WANG, 2014).

Como já mencionado, a administração do siRNA livre (*naked siRNA*) não é adequada, uma vez que a molécula é rapidamente degradada por enzimas ou sistema imune (KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012; MIELE *et al.*, 2012). Neste sentido, a utilização de sistemas de entrega é essencial. Entre os sistemas de entrega descritos na literatura, encontram-se os do tipo viral e não viral (Figura 4) (SARASWATHY; GONG, 2014).

Vetores virais apresentam grande eficiência e habilidade natural em entregar material genético para as células (THOMAS; EHRHARDT; KAY, 2003). Porém, a aplicação deste tipo de carreador é limitada devido à preocupação com a segurança e dificuldade de produção em

larga escala, além de problemas citotóxicos e imunológicos (REISCHL; ZIMMER, 2009; WAEHLER; RUSSELL; CURIEL, 2007). Por outro lado, o emprego de vetores sintéticos, não virais, apresentam vantagens por apresentarem perfis de segurança e eficiência mais facilmente alcançados. Esse tipo de vetor normalmente é classificado de acordo com o material utilizado na composição. Existem nanopartículas inorgânicas (óxido de ferro, ouro, sílica, carbono), partículas orgânicas (lipídicas, lipossomas, poliméricas e dendrímeros), ou partículas híbridas (orgânicas e inorgânicas) entre outras (MIELE *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2010; ZHANG, JING; LI; HUANG, 2014).

Figura 4: Possíveis sistemas de entrega do tipo viral e não viral



1) Adenovírus; 2) Lipossoma; 3) Nanocapsula; 4) Micelas; 5) Dendrímero; 6) Partícula de ouro; 7) Nanopartícula magnética; 8) Nanopartícula híbrida. Adaptado de (KANNAN; XU; KAMBHAMPATI, 2013; LINEMANN *et al.*, 2013; RAEMDONCK *et al.*, 2014; WAEHLER; RUSSELL; CURIEL, 2007)

2.3.1 Acúmulo passivo e ativo

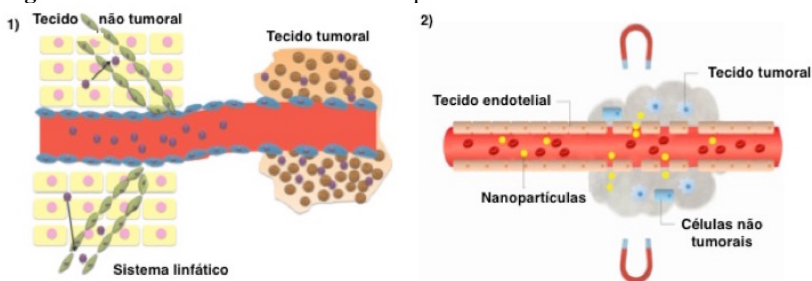
Para o tratamento anticâncer ser eficiente é necessário que o sistema de entrega, após administração, seja capaz de chegar ao tecido alvo com o mínimo de perdas, tanto de volume quanto de atividade. Além disso, o sistema deve ser seletivo no sentido de afetar apenas as células tumorais sem alterar o tecido não tumoral do entorno (MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010). Nesse contexto, as formas de acúmulo no tecido tumoral foram conceituadas como: passiva e ativa.

O direcionamento passivo refere-se ao acúmulo devido às características físico-químicas e fatores farmacológicos, como o tamanho do carreador e estrutura do tecido tumoral. Acontece principalmente devido ao efeito EPR (Permeabilidade e Retenção Aumentadas), uma vez que tumores sólidos apresentam vasos

sanguíneos com arquitetura defeituosa, com grandes fenestrações ($\approx 1 \mu\text{m}$) entre as células endoteliais, o que permite que as nanopartículas escapem da corrente sanguínea e acumulem-se de maneira seletiva no tecido tumoral (Figura 5.1) (BERTRAND *et al.*, 2014; YIN; LIAO; FANG, 2014).

Em contrapartida, o acúmulo ativo ocorre devido às modificações na superfície do sistema carreador. A adição de moléculas específicas, como anticorpos monoclonais favorecem a vetorização de maneira específica às células tumorais (KOSHKARYEV *et al.*, 2013). De forma semelhante, carreadores com característica magnéticas permitem a vetorização ao local do tumor a partir da aplicação de um campo magnético externo (Figura 5.2) (CAO; HAN; LI, 2011)

Figura 5: Mecanismos de acúmulo de spions no tecido tumoral



1) Acúmulo passivo por meio do efeito EPR; 2) Acúmulo ativo pela aplicação de campo magnético externo. Adaptado de (ESTELRICH *et al.*, 2015; YIN; LIAO; FANG, 2014)

2.3.2 Nanopartículas de óxido de ferro

Magnetita (Fe_3O_4), maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematita (Fe_2O_3) são as três principais formas cristalinas respectivas ao óxido de ferro (MAHMOUDI, *et al.*, 2011). Apresentam a propriedade de superparamagnetismos, ou seja, possuem características magnéticas apenas na presença de um campo magnético externo (YEN; PADMANABHAN; SELVAN, 2013).

As nanopartículas superparamagnéticas (spions) destacam-se sobre os diversos sistemas de entrega existentes principalmente por serem biocompatíveis, resistentes à digestão e terem baixo custo de síntese, a qual pode ser sem a utilização de solventes orgânicos por meio da química verde. Apresentam também, alta capacidade de carrear moléculas de DNA/RNA e são facilmente guiadas, de forma estável e eficiente, ao local de ação após aplicação de campo magnético externo

(COLE *et al.*, 2011; GUPTA, AJAY KUMAR, 2005; ROCA *et al.*, 2009).

Devido às diversas vantagens das nanopartículas de óxido de ferro tem-se observado um aumento significativo dos estudos relacionados a síntese e possíveis aplicações desse tipo de carreador (BOGREN *et al.*, 2015; ESTELRICH *et al.*, 2015; LAURENT *et al.*, 2014; YEN; PADMANABHAN; SELVAN, 2013). De maneira complementar, as spions têm sido amplamente utilizadas na área biomédica devido à grande gama de aplicações como sistema de entrega (LAURENT *et al.*, 2014), na captura de imagens por ressonância magnética (MRI) (CHA *et al.*, 2011), na separação magnética (XU, HENGYI *et al.*, 2011) e na terapia por hipertermia (BASEL *et al.*, 2012).

2.3.3 Fosfato de cálcio (CaP)

O fosfato de cálcio (CaP) é um composto inorgânico com diversas características que favorecem seu emprego na síntese de nanopartícula, incluindo ampla disponibilidade, alta funcionalidade e biocompatibilidade (FURUKAWA;KATAOKA., 2004). Adicionalmente, esse sistema apresenta características químicas e estruturais que podem promover afinidades com compostos aniônicos, estabilidade no espaço extracelular, além de uma endocitose eficaz e escape endossomal com liberação gradual no citoplasma das células alvo (PITTELLA *et al.*, 2012).

No corpo humano, o CaP é encontrado na forma cristalina de hidroxiapatita, sendo o principal componente dos ossos, dentes e tendões. Desta forma, não existe dúvida sobre a alta biocompatibilidade deste material (ZHANG, MINGZHEN; KATAOKA, 2009).

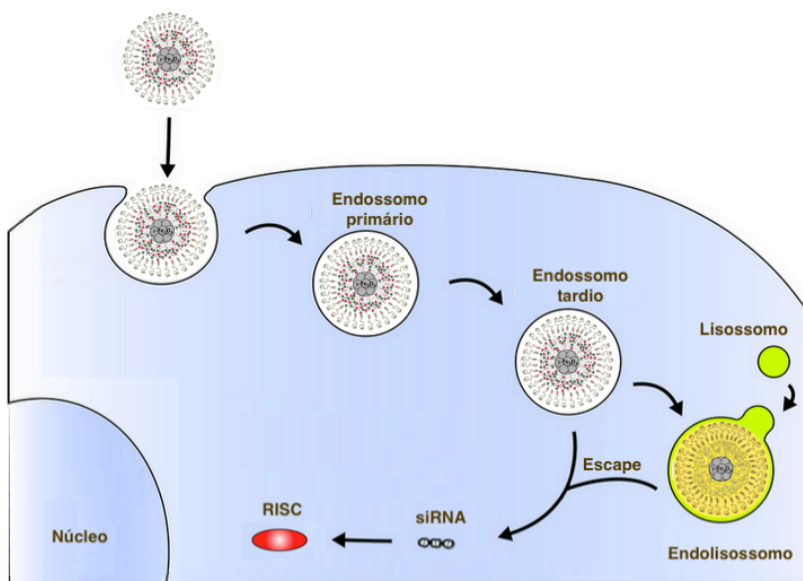
Em 1973 foi relatada a habilidade das nanopartículas de CaP de transportar ácidos nucleicos às células de mamíferos (GRAHAM; VAN DER EB, 1973). A partir de então, estas têm sido amplamente estudadas e utilizadas como sistema de entrega (PUDDU *et al.*, 2015).

Além de proteger das desordens magnéticas, oxidação descontrolada e manter o tamanho e a forma das nanopartícula de óxido de ferro, o revestimento de fosfato de cálcio fornece uma liberação controlada quando em pH ácido (BISHT *et al.*, 2005; MYKHAYLYK *et al.*, 2007). Após captação celular por endocitose, as nanopartículas são levadas ao endossomo primário e endossomo tardio/lisossomo para digestão (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009). O pH ácido da organela favorece a dissolução do revestimento de CaP. Desta forma, a elevada concentração de íons cálcio das nanopartículas provavelmente

faz com que ocorra um intenso influxo de água para o interior da organela. Assim, com o aumento da pressão osmótica, ocorre a ruptura da membrana endossomal liberando o ácido nucléico incorporado à nanopartícula no citoplasma celular (Figura 6) (HUBBELL, 2003; PITTELLA *et al.*, 2011).

Apesar da síntese simples, rápida e barata as nanopartículas de fosfato de cálcio apresentam a limitação de formar cristais após a mistura dos componentes, gerando grandes precipitados ($> \mu\text{m}$) (JORDAN; SCHALLHORN; WURM, 1996; MAITRA, 2005).

Figura 6: Escape endossomal de nanopartículas



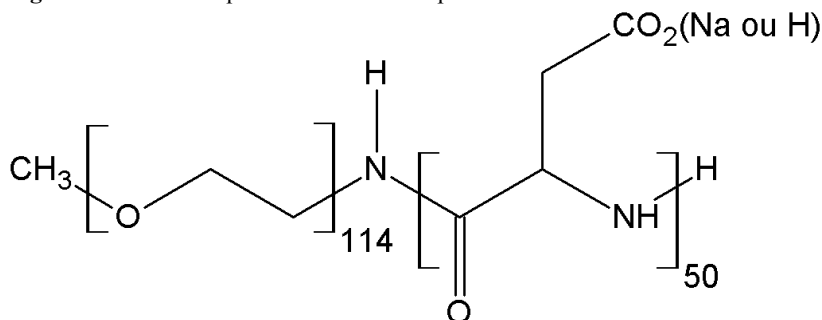
Endocitose da nanopartícula seguida de escape endossomal liberando siRNA no citoplasma celular para ligação ao complexo RISC. Adaptado de (JONES, CHARLES H *et al.*, 2015)

2.3.4 Bloco de copolímero poli (etileno glicol)-bloco-poli aspartato [PEG-PAsp]

Os blocos de copolímeros são macromoléculas compostas por dois ou mais segmentos diferentes (RITA; COELHO; GOMES, 2007). O bloco de copolímero poli (etileno glicol)-bloco-poli aspartato (PEG-PAsp) apresenta uma estrutura em que um dos blocos é hidrofílico enquanto o outro possui características polianiónicas (Figura 7).

A utilização de blocos de copolímero permite controlar o tamanho do revestimento de fosfato de cálcio das nanopartículas de óxido de ferro evitando a formação de cristais e obtendo nanopartículas com tamanho adequado (FURUKAWA;KATAOKA., 2004; GIGER *et al.*, 2011; LI, JUN *et al.*, 2010). O segmento poli aspartato apresenta alta afinidade de ligação com a camada de fosfato de cálcio, além de ser altamente biocompatível e biodegradável, sendo utilizado em diversos estudos para o recobrimento de sistemas nanoparticulados (JANA *et al.*, 2010). Já o segmento de polietilenoglicol (PEG) apresenta caráter hidrofílico e não aniônico sendo extremamente efetivo no aumento da estabilidade coloidal e solubilidade. Desta forma, favorece o não reconhecimento pelo sistema imune fagocitário, garantindo então, um maior tempo de circulação quando aplicado *in vivo* (COLE *et al.*, 2011; GU *et al.*, 2012). (FURUKAWA;KATAOKA., 2004).

Figura 7: Estrutura química do PEG-PAsp



Fonte: Próprio autor.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e aplicar nanopartículas magnéticas revestidas para a utilização como sistema de entrega de siRNA específico para o gene HER-2 em linhagem celular de câncer de mama HER-2 positivo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar a sequência de siRNA específica para o gene HER-2;
- Desenvolver nanopartículas magnéticas como carreadores de siRNA para o gene HER-2;
- Caracterizar a nanopartícula quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e morfologia;
- Avaliar a estabilidade coloidal do nanocarreador;
- Determinar a eficiência de incorporação de siRNA;
- Avaliar a responsividade ao campo magnético externo;
- Realizar estudo *in vitro* de citotoxicidade em linhagem de câncer de mama HER-2 positivo após aplicação do nanocarreador;
- Analisar, *in vitro*, a captação das nanopartículas contendo siRNA;
- Quantificar, *in vitro*, o silenciamento do gene HER-2 em células de câncer de mama HER-2 positivo após aplicação do sistema nanocarreador.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O meio de cultura RPMI, o soro fetal bovino (SFB), penicilina, estreptomicina e TRIzol[®] High-Capacity cDNA Reverse-Transcription Kit e SYBR-Safe DNA Gel Stain foram adquiridos da Invitrogen Corporation (Grand Island, NY, EUA); dimetil sulfoxido (DMSO) e álcool etílico foram adquiridos da Nuclear; ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e carbonato de sódio (Na₂CO₃) foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil); etanol foi adquirido da Merck[®] (Alemanha); hidróxido de sódio (NaOH) foi adquirido da Vetek (Rio de Janeiro, Brasil); tripsina foi adquirida da Cultilab; piruvato de sódio, azul de tripano, albumina bovina (BSA), brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio (MTT), ácido N-[2-Hidroxietil]-piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), cloreto de ferro (II), cloreto de ferro (III), ferrozine, neocuproine, tampão cacodilato de sódio e kit ELISA para HER-2 foram adquiridos da Sigma[®] (St. Louis, MO, EUA). Formaldeído, glutaraldeído e acetona DNase kit PCR 2X Master Mix Kit e SYBR-Green foram adquiridos da Thermo Scientific[®] (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA); RNase foi adquirida da Promega[®] (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

4.2 CONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE siRNA

As sequências de siRNA que promovem o efeito RNAi por meio da degradação do mRNA do gene HER-2 (siHER2) foram construídas a partir da sequência do gene descrita no banco de dados público do Genoma Humano (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). A sequência complementar ao mRNA foi escolhida de acordo com a seletividade obtida pela homologia-BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) por meio de uma ferramenta online (<http://sirna.wi.mit.edu/home.php>). Sequências com alto grau de homologia a outros genes foram descartadas (REYNOLDS *et al.*, 2004). Após seleção, moléculas de siRNA foram adquiridas da Sigma[®] (St. Louis, MO, EUA).

4.3 SÍNTESE DO NÚCLEO DE ÓXIDO DE FERRO

4.3.1 Síntese das nanopartícula de óxido de ferro

As nanopartículas de óxido de ferro (IO-NP) foram sintetizadas utilizando a técnica de co-precipitação de cloretos de ferro (II) e ferro (III) em solução aquosa, conforme um protocolo descrito previamente (SIERRA-RESTREPO, 2015). Para isso, foi preparada uma solução contendo $0,64 \text{ mol.L}^{-1}$ de FeCl_3 (PM= 270,32 g/mol) e $0,32 \text{ mol.L}^{-1}$ de FeCl_2 (PM = 126,75 g/mol) em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Esta solução foi adicionada lentamente ($0,5 \text{ mL/min}$) a uma solução de $\text{NH}_4\text{OH } 1,5 \text{ mol.L}^{-1}$. O sistema foi mantido sob vácuo, em aquecimento de 30°C e agitação, com agitador magnético, por 30 minutos. Por fim, com o auxílio de um ímã permanente de neodímio (N35) as IO-NP foram separadas e lavadas com água ultrapura até alcançarem um valor de pH próximo a 7,0. Em seguida, foram armazenadas em condições com pouco oxigênio e à temperatura ambiente até o revestimento.

4.3.2 Revestimento das IO-NP com ácido cafeico

A fim de melhorar a estabilidade coloidal, as IO-NP foram revestidas com ácido cafeico numa proporção molar de 1:1:1 de ferro, ácido cafeico e NaOH (VANONI; SIERRA-RESTREPO; CRECZYNSKY-PASA 2014, dados não publicados). Para isso, a densidade aparente (d_{ap}) das IO-NP foi estimada tomando uma alíquota da formulação e levando-a à estufa a 37°C durante 24 horas, para a evaporação do líquido. Ao final, a massa relativa às IO-NP foi calculada utilizando a Equação 1.

$$d_{ap} = x - y \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

x = Massa do microtubo vazio antes de ir à estufa

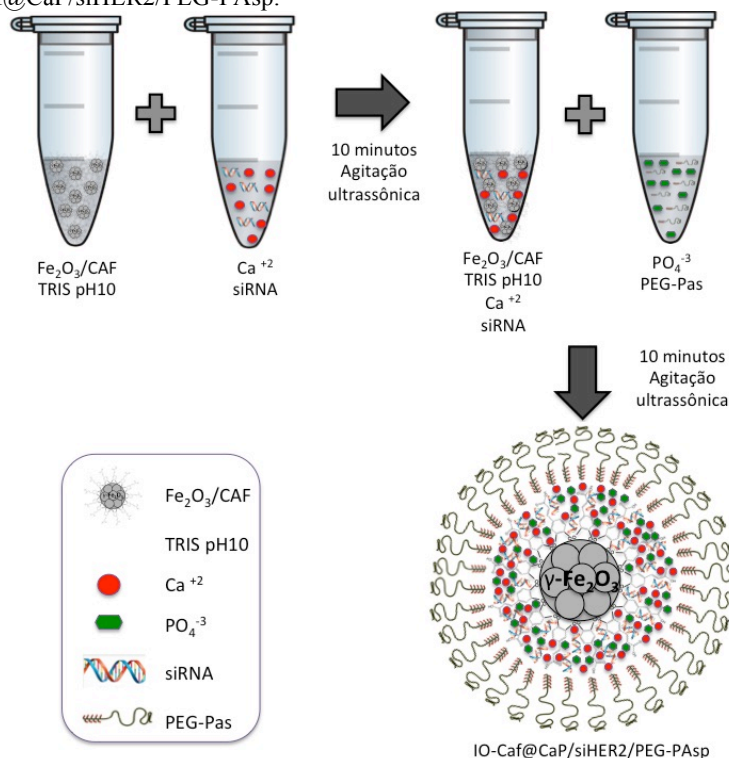
y = Massa do microtubo contendo as nanopartículas após ir à estufa

Posteriormente, a suspensão IO-NP foi misturada com ácido cafeico em $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e deixada sob agitação de uma ponta de ultrassom (Vibracells, USA) na potência de 7 Watts, em banho de gelo, durante 30 minutos. Em seguida, as IO-caf foram autoclavadas por 20 minutos a 120°C para garantir a esterilidade. Todos os procedimentos feitos a partir deste ponto foram realizados em fluxo laminar (SIERRA-RESTREPO, 2015).

4.4 MONTAGEM DO SISTEMA CARREADOR DE siRNA

As nanopartículas foram preparadas pela técnica de camada por camada (*layer by layer*), sob agitação de uma ponta de ultrassom (Vibracells, USA) na potência de 6 Watts, em banho de gelo. O núcleo das nanopartículas foi formado pelas IO-caf, seguida por uma camada de fosfato de cálcio (CaP) ligando moléculas de siRNA. Enquanto que a camada mais externa era formada por bloco de copolímero poliânion (KAKIZAWA, Y. *et al.*, 2004; PITTELLA *et al.*, 2012). Foram preparadas soluções de CaCl_2 $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$, tampão TRIS $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4 e pH 10,0 e HEPES $5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ /Fosfato $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. O copolímero PEG-PAsp (5K - 50DP) foi diluído, em tampão TRIS-HCl, na concentração de $800 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Enquanto que o siRNA foi diluído em tampão HEPES 10 mM pH 7,4 na concentração de $15 \text{ } \mu\text{M}$. Para a síntese das nanopartículas, primeiramente foi preparada uma solução contendo as IO-Caf em tampão TRIS pH 10 (1:60 v/v), a qual foi adicionada, com agitação manual, a uma solução de CaCl_2 em tampão TRIS pH 10 (1:12 v/v), contendo siHER2 ($1,6 \text{ } \mu\text{M}$). Então, essa nova solução foi deixada durante 10 minutos sob agitação de uma ponta de ultrassom na potência de 6 Watts. Em seguida, foi adicionada uma solução de PEG-PAsp e Hepes/Fosfato (5:8 v/v) e a agitação ultrassônica foi mantida por mais 10 minutos. No final dos 20 minutos, foi obtida uma suspensão contendo as nanopartículas carreadoras de siRNA (IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp). O Esquema 2 apresenta o processo de síntese.

Esquema 2: Esquema ilustrativo do processo de síntese das nanopartículas IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp.



4.5 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS

4.5.1 Avaliação morfológica das nanopartículas

A determinação do tamanho e forma das IO-Caf e IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp foram realizados por meio da microscopia eletrônica de transmissão (TEM), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, utilizando o equipamento JEM-1011 (Jeol Ltd., Japan) operado a 80 kV. Para as análises, as amostras foram depositadas sobre grades de níquel (200 mesh) previamente revestidas com parlodiom® e carbono amorfo. Então, foram deixadas para secar à temperatura ambiente sobre papel filtro. A distribuição de tamanho foi determinada pelo diâmetro de Feret, utilizando o software ImageJ® a partir das partículas obtidas nas imagens adquiridas (REINKING, 2016; SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

4.5.2 Determinação do tamanho da partícula e índice de polidispersão

A distribuição de tamanho e índice de polidispersão das IO-Caf e IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PASp foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) em ângulo de detecção de 173° e laser He-Ne a 633,3 nm. As análises foram realizadas em triplicatas, à temperatura de 25°C, utilizando cubetas de quartzo (ZEN2112) previamente lavadas com água destilada. Para todas as medidas, adotou-se a viscosidade de 1,054 referente ao tampão TRIS e para o cálculo da distribuição de tamanho em número, o componente real do índice de refração da magnetita utilizado foi 2,63 e a absorção foi de 0,2 (KUNZ *et al.*, 2013).

4.5.3 Determinação da carga superficial

A carga superficial foi avaliada a partir das medidas de mobilidade eletroforética obtidas por anemometria de laser Doppler em um campo elétrico de 150 V/cm. Os dados foram ajustados e transformados em valores de potencial zeta automaticamente pelo software do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) usando a equação de Smoluchowski (PFEIFFER *et al.*, 2014). A suspensão de nanopartículas foi previamente diluída em solução NaCl 0,1M na proporção de 1:100 e colocada em célula capilar (DTS1060), fazendo em seguida a leitura em triplicata, a 25°C.

4.5.4 Determinação do ponto isoelétrico

O estudo da mudança da carga superficial das IO-NP foi realizado por meio da mobilidade eletroforética em diferentes valores de pH. A mesma análise foi realizada, com as IO-caf antes e após a esterilização da suspensão por autoclave, 20 min a 120°C. Para isso as amostras foram diluídas em NaCl 0,1 mol.L⁻¹ (1:100 v/v) e o pH ajustado em 1,8; 3,1; 6,5; 9,6 e 11,4. Em seguida, a mobilidade eletroforética das nanopartículas a 25°C foi determinada em triplicata no Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®, UK) e transformada em valores de potencial zeta.

4.5.5 Determinação do tamanho da partícula e concentração: análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

NTA utiliza as propriedades de espalhamento de luz dinâmico e movimento Browniano a fim de obter a distribuição de tamanho das partículas em suspensão (HOLE *et al.*, 2013). As medidas, com as IO-

Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp, foram feitas no equipamento Nanosight NS300 (Malvern Instruments®, UK). Para isso, a suspensão de nanopartículas foi diluída em água destilada, e injetada na câmara de amostra utilizando seringa estéril, até preenchimento completo do compartimento (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010). Todas as medidas foram realizadas a 25°C. A partir das imagens obtidas, o software do equipamento calculou o diâmetro hidrodinâmico e a concentração das partículas em suspensão.

4.5.6 Análise de composição elementar das IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp

A análise para determinar a composição química de um filme preparado com as IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp foi realizada por espectroscopia de emissão de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) em um espectrômetro Thermo Scientific ESCALAB 250xi, na Universidade Federal Fluminense. Para a análise, foi utilizado o ânodo de Al (radiação monocromática $K\alpha$ - energia de 1486.6 eV e uma largura de linha típica de 0,83 eV). Uma gota da suspensão de nanopartículas purificadas foi depositada sobre um *wafer* de silício, e seca ao ar para formar um filme. A pressão na câmara do espectrômetro foi de 7×10^{-9} mbar. As energias de passagem do analisador foram de 100 eV no modo *survey* e 25 eV no modo *scan* de alta resolução. Todos os picos foram ajustados usando curvas de Gauss-Lorentz (GL30) após a remoção de elétrons de fundo, utilizando o método Shirley.

4.5.7 Determinação da eficiência de incorporação de siRNA no sistema carreador

A fim de avaliar a capacidade de incorporação de siRNA pelas IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp, duas análises foram realizadas, uma com caráter quantitativo (Quant-iT™ microRNA Assay Kit) e outra com caráter semi-quantitativo (eletroforese em gel de agarose). Para as análises, as amostras de nanopartículas foram centrifugadas sob uma força de 47.800 $\times g$ durante 6 horas a 4°C. Posteriormente, uma alíquota do sobrenadante foi cuidadosamente coletada para quantificação. A determinação da eficiência de incorporação (%) de siRNA foi realizada por meio da Equação 2.

$$\text{Eficiência de Incorporação (\%)} = \frac{(A-B) * 100}{A} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

A = Concentração teórica inicial

B = Concentração presente no sobrenadante

4.5.7.1 *Quant-iT™ microRNA Assay Kit*

Para as análises, uma alíquota de amostra foi adicionada à solução de trabalho, formada pelos reagentes A e B (1:200 v/v), em uma placa de 96 poços branca. Posteriormente, a fluorescência foi medida utilizando um espectrofluorímetro (PerkinElmer® LS55, USA) com excitação/emissão máximas em 500/525 nm. Por fim, a partir de uma curva de calibração (0 – 1,5 µM), foi possível interpolar os valores de fluorescência e determinar a concentração de siRNA presente nos sobrenadantes analisados.

4.5.7.2 *Eletroforese em gel de agarose*

A quantidade de siRNA incorporada no sistema carreador foi analisada por eletroforese, em gel de agarose a 1%, e corado com azul de bromofenol. Foram aplicadas misturas contendo 5 µL de cada amostra e 1 µL de azul de bromofenol. A corrida foi realizada a 80 V e 100 mA, por 40 minutos, em tampão TAE. Por fim, os géis foram fotografados sob iluminação ultravioleta de 302 nm, pelo equipamento Enduro™ Gel Documentation System (Labnet International, USA). A quantificação das bandas foi feita utilizando o software ImageJ®.

4.5.8 Estudo de estabilidade coloidal

A variação do tamanho médio e índice de polidispersão das IO-*caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp*, quando estocadas em diferentes temperaturas por 42 dias, foi avaliada pela técnica de DLS no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®, UK). Para isso, as amostras foram armazenadas tal como preparadas ou suspensas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB em geladeira a 4°C, em armário a 25°C e em estufa a 37°C, durante 42 dias. Medidas de tamanho e Pdl foram tomadas nos tempos, 0, 4, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias.

4.5.9 Análise de estabilidade do sistema nanocarreador após liofilização

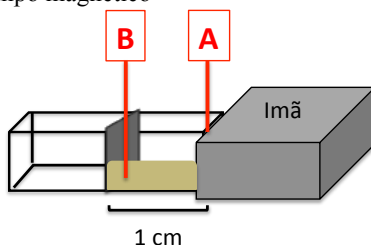
Alterações do tamanho médio e índice de polidispersão das IO-

Caf@CaP/PEG-PAsp foram avaliados pela técnica de DLS, após a suspensão de nanopartículas, não contendo siRNA (Mock), passar pela operação de secagem por liofilização. Para a análise foram utilizados dois frascos de vidro contendo 3,0 mL de nanopartículas; um deles foi adicionado 10% de dextrose (v/v) como agente crioprotetor. Após o congelamento, as amostras foram levadas ao equipamento Liofilizador LD 1500 (Terroni Ltda., SP, Brasil), onde ficaram durante 24 horas sob pressão de 872 mmHg e temperatura de condensação de -46°C . As nanopartículas foram ressuspensas em 3,0 mL de água ultrapura seguidas pela análise por DLS.

4.5.10 Estudo de responsividade ao campo magnético das IO-Caf@CaP/PEG-PAsp

A capacidade de direcionamento e responsividade das nanopartículas a aplicação de um campo magnético externo foram avaliados utilizando um dispositivo retangular (cubeta), aberto em um dos eixos longitudinais, com um bloqueio interno colocado a 1 cm de distância da base (Esquema 3). Nessa área, de 1 cm^2 , foram adicionados 300 μL da suspensão de IO-Caf@CaP/PEG-PAsp. Após coletar a amostra correspondente ao tempo zero (100 μL), foi posicionado um ímã de neodímio na base, durante 30, 60 e 120 minutos. No término de cada tempo, ainda com o ímã posicionado na base do dispositivo, uma alíquota (100 μL) foi coletada da região mais afastada do ímã (Ponto B), e toda a suspensão foi removida. Devido a força magnética, as nanopartículas foram atraídas e aderidas à base do dispositivo. Desta forma, para recuperar e ressuspender as nanopartículas na região mais próxima ao ímã, (Ponto A), o ímã foi afastado e 100 μL de tampão TRIS pH 10 foram adicionados. A quantificação de ferro foi feita apenas nas alíquotas correspondentes aos pontos A e B.

Esquema 3: Esquema ilustrativo do dispositivo utilizado para o estudo de responsividade ao campo magnético



A, representa o ponto de coleta mais próximo (0 cm) do campo magnético e B, o ponto mais afastado (1 cm) do campo magnético.

4.5.10.1 Quantificação de Ferro

A quantificação de ferro contido nas IO-Caf@CaP/PEG-PAsp foi feita pelo método de ferrozine descrito por Riemer e colaboradores, com algumas modificações (RIEMER *et al.*, 2004). O ensaio baseia-se na capacidade que o ácido ascórbico tem de reduzir os íons de ferro a Fe^{+2} . Este, por sua vez, forma um complexo de cor violácea ao ligar-se na ferrozine. A coloração obtida é proporcional à quantidade de ferro presente na amostra (PETERS *et al.*, 1956; STOJCESKI; MALPAS; WITTS, 1965). Para o ensaio, as amostras foram incubadas com NaOH 50 mM, HCl 10 mM e o reagente de liberação de ferro preparado no momento de uso (HCl 1,4 M e KMnO_4 4,5 % p/v em água) durante 16 horas a 37°C. No dia seguinte, depois das amostras resfriadas à temperatura ambiente, foi adicionado o reagente de detecção do ferro (ferrozine 6,5 mM; neocuproína 6,5 mM; acetato de amônio 2,5 M, ácido ascórbico 1 M em água qsp 10 mL), agitadas vigorosamente em vortex e deixadas, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Em seguida, foi medida a absorbância a 560 nm em leitor de microplacas (ELX800, BioteK, Vermont, EUA). A determinação dos teores de ferro foram obtidos por interpolação nas curvas de calibração feitas com padrão de FeCl_3 (0 – 4,1 $\mu\text{g/mL}$) em HCl 10 mM, água, reagente de liberação do ferro e reagente de detecção do ferro.

4.5.11 Purificação das nanopartículas

Devido à presença de um excesso de íons na suspensão de nanopartículas, as mesmas foram purificadas previamente aos testes *in vitro*, realizados com a linhagem celular de câncer de mama.

A purificação foi feita utilizando um dispositivo de ultrafiltração *Vivaspin*TM 500 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany), com membrana de polietersulfona (PES) de 10 kDa (MWCO). A recuperação das partículas é possível devido ao *design* vertical e fino da câmara de filtração, o processo minimiza o entupimento da membrana e requer pouco tempo de centrifugação. Para a purificação, 500 μL da suspensão de nanopartículas foram adicionados ao dispositivo. Após um ciclo de 30 minutos de centrifugação a 15.000 $\times g$ a 4°C, 50 μL de nanopartículas purificadas foram recuperadas e o volume ajustado até 500 μL com tampão TRIS pH 10, a fim de voltar à concentração inicial da formulação.

4.6 INTERAÇÕES NA INTERFACE CÉLULA-NANOPARTÍCULAS

4.6.1 Cultura Celular

Foi utilizada a linhagem celular HCC1954 de câncer de mama HER-2 positivo de origem humana, adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ: 0280). As células foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 4,5 g/L dextrose, 110 mg/L de piruvato de sódio, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina; pH 7,4, em estufa umidificada a 37°C e com 5% CO₂. Antes de cada experimento, as células foram lavadas com tampão PBS (1×), soltas com tripsina para posterior contagem em câmara de Newbauer utilizando Azul de Tripiano. O tipo de placa, número de células plaqueadas e tempo de incubação foram ajustados para cada experimento.

4.6.2 Citotoxicidade das IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp

A citotoxicidade do sistema nanocarreador IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp foi avaliada pelo ensaio de MTT, o qual baseia-se na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5- difenil-2H-tetrazólio (MTT) em formazan púrpura, determinado espectrofotometricamente a 540 nm. A reação acontece apenas em células viáveis, uma vez que a clivagem do anel de tetrazólio ocorre principalmente devido à ação de desidrogenases mitocondriais. Desta forma, o formazan formado é proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, em condições padrões de cultura celular, com os tratamentos por 24 e 48 horas. Foram plaqueadas, $2,0 \times 10^4$ células para o tempo 24 horas, e $1,5 \times 10^4$ células para 48 horas. Em ambos os casos, foram adicionados os tratamentos com a suspensão de IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp e IO-Caf@CaP/PEG-PAsp (sem siRNA ou Mock), nas concentrações equivalentes a 10, 50 e 100 nM de siHER2, além de 100 nM siHER2 livre (*siHER2 naked*) e controle, apenas com meio de cultura. Após os tempos pré-estabelecidos, foi adicionada solução de MTT (0,25 µg/µL) e as células foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C. Após este período, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e substituído por DMSO (100%), a fim de solubilizar os cristais de formazan formados. Posteriormente, a absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplaca (ELX800, BioteK, Vermont, EUA). A absorbância do grupo controle foi considerada como 100% de células viáveis e a viabilidade dos demais tratamentos foi calculada por regra de três simples.

4.6.3 Captação celular das IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp

A fim de verificar a captação das IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp pelas células de câncer de mama HER-2 positivo, três diferentes metodologias foram utilizadas.

4.6.3.1 Quantificação do ferro intracelular

O aumento das concentrações de ferro intracelular foi usado como medida indireta da captação do sistema IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp, após aplicação de um campo magnético externo em diferentes tempos. Para isso, 1×10^5 células HCC1954 foram distribuídas em placas de 24 poços. Após 24 horas, foi adicionado o sistema carreador contendo 100 nM siHER2, equivalendo aproximadamente a 6 µg de ferro. A fim de viabilizar a detecção, foram utilizadas partículas com concentração 3 vezes maior de ferro.

Terminados os tempos de 30, 60, 120 minutos e 24 horas de exposição ao campo magnético externo (ímã de neodímio, N35 – 1800 Gauss) o meio de cultura foi trocado e as células voltaram à estufa por mais 24 horas. Após a incubação, a captação das nanopartículas foi determinada pelo método de ferrozine.

As células foram cuidadosamente lavadas com tampão PBS $1 \times$ a fim de remover as nanopartículas não captadas presentes no sobrenadante e, em seguida, foram soltas com a ajuda de um rodo para cultura celular. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a $16.000 \times g$ a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. Então, foram adicionados 100 µl de NaOH 50 mM e os microtubos foram levados ao banho de ultrassom por 20 minutos, para lisar as células. Em seguida, 100 µl de HCl 10 mM foram adicionados e outro ciclo de ultrassom foi realizado. Por fim, uma alíquota de 20 µl de lisado foi separada para a quantificação de proteínas totais (Método de Lowry) e o restante foi usado no método de ferrozine. A taxa de captação das nanopartículas foi normalizada pela quantidade de proteínas totais presente em cada poço.

4.6.3.1.1 Dosagem de Proteínas Totais

A determinação de proteínas totais foi feita pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Em placa de 96 poços, 10 µl dos lisados celulares foram diluídos com 40 µl de água destilada (1:5 v/v). Posteriormente, foram adicionados 150 µl do Reagente de Lowry (solução cupro-alcalina: Na_2CO_3 4%, NaOH 0,2 M, tartarato de sódio e potássio 2% e CuSO_4 1%) e deixadas sob agitação por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 15 µl de solução Folin 2M e deixadas sob agitação e protegidas da luz por 30 minutos.

Por fim, a leitura da absorbância foi realizada a 750 nm em um leitor de microplaca (ELX800, Biotek, Vermont, EUA). As concentrações foram obtidas a partir de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina ($1 - 1,95 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

4.6.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi usada na visualização dos núcleos de ferro no IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp no interior das células. Para o ensaio, 3×10^5 células HCC1954/poço foram incubadas com o sistema carreador contendo 100 nM de siHER2, sem aplicação de campo magnético. Meio de cultura foi utilizado como controle. Após 24 horas, as células foram soltas com tripsina, transferidas para um microtubo e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. O decantado foi lavado com tampão PBS 1× e as amostras foram preparadas de acordo com manuais de microscopia eletrônica (BUILDING, 2010; GUPTA; GUPTA, 2005).

As amostras foram fixadas com solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) por 2,5 horas. Posteriormente foram lavadas três vezes, com tampão PBS 1× e deixadas durante 2 horas à temperatura ambiente com solução 1% de tetróxido de ósmio. Após duas lavagens, de 10 minutos, com tampão cacodilato 0,1 M, as amostras foram deixadas 16 horas em tampão cacodilato a 4°C. A desidratação, então, foi realizada em concentrações crescentes de acetona (30, 50 70, 80, 90, 100 e 100%) durante 10 minutos cada etapa. Em seguida, as amostras foram embebidas em resina Spurr, colocadas em moldes apropriados e incubadas na estufa, a 70°C, por 24 horas para completa polimerização. Posteriormente, foram feitos cortes semifinos em lâminas de vidro, seguidos de cortes ultrafinos, com lâmina de diamante. Por fim, os *grids*, contendo os cortes ultrafinos, foram contrastados com acetato de uranila (30 minutos), citrato de chumbo (5 minutos) e analisados por TEM, usando voltagem de aceleração de 80 Kv.

4.6.3.3 Microscopia de fluorescência confocal

Células HCC1954 (2×10^5 células/poço) foram sub-cultivadas sobre lamínulas de vidro estéreis, pré-tratadas com solução piranha alcalina (NH_3OH 4%, H_2O ultrapura 2% e H_2O_2 4%) lavadas com água destilada e dispostas em placas de 6 poços. As células foram tratadas com 200 nM de *siRNA naked* marcado com cianina-5 (siCy5), IO-Caf@CaP/siCy5/PEG-PAsp carreando 200 nM siCy5 sem e com aplicação de campo magnético (N35 - 1500 Gauss). O campo

magnético, quando aplicado, foi deixado durante 60 minutos e, em seguida, o meio foi trocado. Os controles foram mantidos apenas com meio de cultura. As células foram incubadas a 37°C por 24 horas, ao abrigo da luz. Após o tempo de incubação, foi feita a marcação de endossomos/lisossomos com 250 μ M do fluoróforo verde Lysotracker Green DND-26 (Thermo Scientific®) por 60 minutos. Em seguida, as lamínulas foram retiradas, com a ajuda de uma pinça estéril, e colocadas sobre lâminas contendo 20 μ L de tampão PBS 1 \times .

As análises foram feitas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC, utilizando microscópio confocal Leica DMI6000 B (Leica Microsystems®) com óleo de imersão e objetiva de 63 \times . Os comprimentos de onda para excitação foram 633 nm (laser de He-Ne) e 488 nm (laser de Ar).

Além da observação da presença de siCy5 e IO-Caf@CaP/siCy5/PEG-PAsp no compartimento intracelular, utilizou-se a quantificação da colocalização como técnica analítica para investigar se duas estruturas estavam compartilhando o mesmo espaço no citosol ou no lisossomo (BOLTE; CORDELIÈRES, 2006). As taxas de colocalização foram determinadas no software Leica LAS AF Lite®, versão: 2.6.3 *build* 8173, quantificando a sobreposição das cores verde (endossomo/lisossomo) e vermelha (sicy5).

4.6.4 Silenciamento gênico mediado por RNA de interferência

A expressão do gene HER-2 e seu possível silenciamento provocado pela ação do siHER2 carregado no sistema desenvolvido neste trabalho foi avaliada no nível de mRNA por qRT-PCR. Para isso, células HCC1954 $1,5 \times 10^5$ células/poço, foram sub-cultivadas, em placas de 12 poços, e tratadas com 100 nM de *siHER2 naked*, IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp carregando 100 nM siHER2, ou mantidas só em meio de cultura como controle. Análises foram feitas com e sem a aplicação de um campo magnético externo (ímã permanente de neodímio N35 – 1.500 Gauss) durante 60 minutos. Então, após o tempo determinado, o meio de cultura foi substituído e as células foram incubadas em estufa, a 37°C e 5% CO₂ por 48 horas.

4.6.4.1 Modulação dos níveis de mRNA por qRT-PCR

4.6.4.1.1 *Extração de RNA*

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol[®] (Gibco[®]). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µl de clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente em vortex. Para a separação das fases, os microtubos foram centrifugados a 4°C por 15 minutos a 12.000 ×g. A fase aquosa, então, foi coletada e transferida para um novo microtubo, no qual foram adicionados 500 µl de álcool isopropílico. Após agitação vigorosa, incubação de 10 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 12.000 ×g. O sobrenadante foi descartado, o decantado de RNA foi lavado com etanol 75% e posteriormente centrifugado a 4°C por 5 minutos a 7.500 ×g. O sobrenadante foi novamente removido e o decantado foi seco a temperatura ambiente durante 60 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 µl de água livre de RNase, o RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria UV no equipamento NanoVue[®] (GE Healthcare) e avaliado quanto à pureza, por meio da razão de absorbâncias a 260/280. Finalmente, 2 µg de RNA foram transferidos para microtubos de 200 µl e tratados com DNase I (Invitrogen[®]) de acordo com protocolo do fabricante.

4.6.4.1.2 *Síntese de DNA complementar (cDNA)*

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems[®]) e protocolo indicado pelo fabricante. Todas as incubações foram realizadas em termociclador Biocycler (BioSystems, Curitiba, Brasil). Os cDNA sintetizados foram armazenados a -20°C até sua utilização para as reações de amplificação por reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR).

4.6.4.1.3 *Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (qRT-PCR)*

A expressão do gene HER-2 foi quantificado por meio do método qRT-PCR utilizando o aparelho StepOnePlus Real-time RT-PCR System (Applied Biosystems[®]). A análise foi normalizada pela expressão do gene constitutivo beta actina (β -actina) e foi feita com o kit Power SYBR-Green PCR Master Mix[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) conforme indicações do fabricante. A sequência dos iniciadores utilizados para o gene HER-2 e β -actina estão descritos na

Tabela 1. O ensaio foi realizado nas seguintes condições: 50°C por 2 min e 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C, para a desnaturação e, por fim, 1 min a 60°C para anelamento e extensão da cadeia. Para todos os experimentos, o limiar de amplificação denominado de Cycle threshold (Ct) foi determinado automaticamente pelo software.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores utilizados na qRT-PCR

Gene	Sequência	(5' – 3')
HER-2*	Senso	TCCGTTTCCTGCAGCAGTCTCCGCA
	Antissenso	AGAGAGCCAGCCCTCTGACGTCCAT
β-actina	Senso	CCAACCGCGAGAAGATGA
	Antissenso	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

*(LIU, KUN *et al.*, 2014)

4.7 Análise estatística:

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de ensaios repetidos; analisados pelo programa Graphpad Prism[®] 6. As comparações estatísticas foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do pós teste de Dunnett e Bonferroni. Valores de probabilidade menor que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE siRNA

Na literatura existem trabalhos que desenvolveram e avaliaram a eficiência de diferentes sequências de siRNA específicos para a proteína HER-2. Entretanto, avaliaram o efeito em diferentes linhagens celulares utilizando reagentes de transfecção comerciais, desenvolvidos para análises *in vitro* (CHOUDHURY *et al.*, 2004; FALTUS *et al.*, 2004; LIU, KUN *et al.*, 2014; TAI; QIN; CHENG, 2010). Diante disto, para esse trabalho, optou-se por construir e utilizar uma sequência inédita, a qual está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências do siRNA utilizada

Gene	Sequência	(5' – 3')
HER-2	Senso	UCACAGGUUACCUAUACAU dTdT
	Antissenso	AUGUAUAGGUAACCUGUGAdTdT

5.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO NÚCLEO DE ÓXIDO DE FERRO

As nanopartículas de óxido de ferro (IO-NP) foram sintetizadas utilizando a técnica de co-precipitação de íons Fe^{+2} e Fe^{+3} em uma solução básica sob constante homogeneização (SIERRA-RESTREPO, 2015). A metodologia é utilizada com frequência provavelmente pela simplicidade e reprodutibilidade devido à eficiência da via química (LAURENT *et al.*, 2008). Cuidados foram tomados para garantir uma síntese homogênea, como a utilização de um sistema à vácuo e a relação molar de [1:2] entre os íons $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$, de forma a favorecer a formação da forma cristalina Fe_3O_4 (magnetita) frente a de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maguemita) (CHIN; IYER; RASTON, 2009).

Entretanto, de forma complementar, foi realizada a análise de XPS das IO-NP. A metodologia permite caracterizar o estado cristalino do óxido de ferro, o qual pode ser hematita (Fe_2O_3), magnetita (Fe_3O_4), maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (LEGODI; DEWAAL, 2007). A análise revelou uma suspensão com 77% de maguemita e 23% de magnetita, conforme demonstrado no Apêndice A (SIERRA-RESTREPO, 2015). A predominância da forma maguemita pode ser explicada devido ao fato da Fe_3O_4 ser sensível à oxidação (LAURENT, *et al.*, 2008), além disso a fim de se ter uma síntese sem a utilização de solventes orgânico, pela química verde, a reação utilizou solução básica de hidróxido de amônio, a qual não permitiu chegar à faixa de pH dita ideal (9,7 – 10,6) para a

produção de uma população pura de magnetitas (DORNIANI *et al.*, 2012). Todavia, vale ressaltar que uma maior obtenção da forma de maguemita não prejudica a capacidade magnética do óxido de ferro já que ambas formas cristalinas respondem ao campo magnético externo (TURAL; ÖZKAN; VOLKAN, 2009).

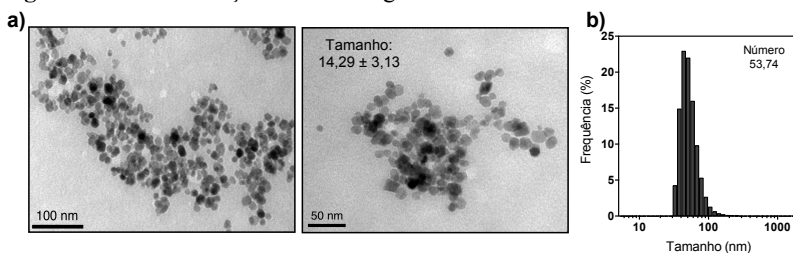
O tamanho reduzido das nanopartículas de óxido de ferro é vantajoso por proporcionar a propriedade de alta razão superfície/volume, a qual confere uma maior área superficial disponível para a ligação de biomoléculas (MAHMOUDI, *et al.*, 2011). Porém, em contrapartida, essas partículas tendem a apresentar uma estabilidade coloidal reduzida devido às interações hidrofóbicas existentes entre partículas muito pequenas, resultando na formação de aglomerados em suspensão (LIM *et al.*, 2013). Nesse sentido, modificações da superfície apresentam-se como uma estratégia interessante a fim de garantir uma melhora na dispersão e propriedades físico-químicas (CHOMOUCKA *et al.*, 2010) além de ser uma alternativa para a sua aplicação como sistema de entrega (DE MONTFERRAND *et al.*, 2013).

Dentre as diversas substâncias disponíveis para o revestimento das nanopartículas de óxido de ferro, foi descrita a avaliação da utilização de três diferentes ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido gálico e ácido ferúlico) e foi observado que unicamente os dois primeiros apresentaram-se viáveis na estabilização das IO-NP (VANONI; SIERRA-RESTREPO; CRECZYNSKY-PASA 2014, dados não publicados). De maneira complementar, o ácido cafeico apresenta duas propriedades interessantes que podem somar-se como vantagens: a) a presença da função catecol, a qual garante afinidade de ligação irreversível sobre a superfície do óxido de ferro (AMSTAD *et al.*, 2009) e b) o grande número de funcionalidades COOH disponíveis sobre o núcleo magnético, que podem ser utilizadas para a ligação de biomoléculas (LALATONNE *et al.*, 2008).

Os núcleos formados pelas nanopartículas de óxido de ferro recobertos com ácido cafeico (IO-caf) foram inicialmente caracterizados pela microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Figura 8a), e apresentaram tamanho homogêneo e formato predominantemente arredondado. A distribuição de diâmetro obtida por meio do software *ImageJ*®, revelou tamanho médio de 14 nm. O que foi compatível ao encontrado na literatura, em que nanopartículas de Fe₃O₄ com quitosana (estabilizante) e ácido gálico (molécula sendo carregada), apresentaram um tamanho médio e formato semelhantes quando analisadas por TEM (DORNIANI *et al.*, 2012).

As IO-caf foram posteriormente caracterizadas pela técnica de DLS, apresentando diâmetro hidrodinâmico médio, por intensidade, de $93,24 \pm 1,13$ nm e índice de polidispersão de $0,147 \pm 0,006$. Como pode ser observado nas imagens da Figura 8a, as nanopartículas revestidas com ácido cafeico apresentaram núcleos dispersos, o que permite serem visualizados individualmente por TEM. Complementarmente o valor obtido por número para a distribuição de tamanho foi consideravelmente menor do que o valor obtido na técnica de DLS, histograma demonstrado na Figura 8b. Para as leituras através da técnica de espalhamento de luz (DLS), as nanopartículas devem apresentar-se com estabilidade coloidal, de forma que a leitura seja realizada pela camada mais externa hidratada, levando em consideração, além do tamanho dos núcleos, a camada de estabilizante orgânico e os efeitos de solvatação. Assim, os valores médios obtidos por intensidade possivelmente dizem respeito aos pequenos aglomerados de sua distribuição. No entanto, a técnica de DLS fornece análises *in situ* simples e rápidas, além de permitir a reutilização da amostra (LIM *et al.*, 2013). De maneira complementar, a distribuição calculada por número indica quantas partículas existem em cada faixa de tamanho enquanto que a análise por intensidade descreve a quantidade de luz espalhada pela partícula em cada faixa de tamanho (MALVERN, 2011; MALVERNS, 2014).

Figura 8: Caracterização da morfologia e tamanho médio das IO-caf.

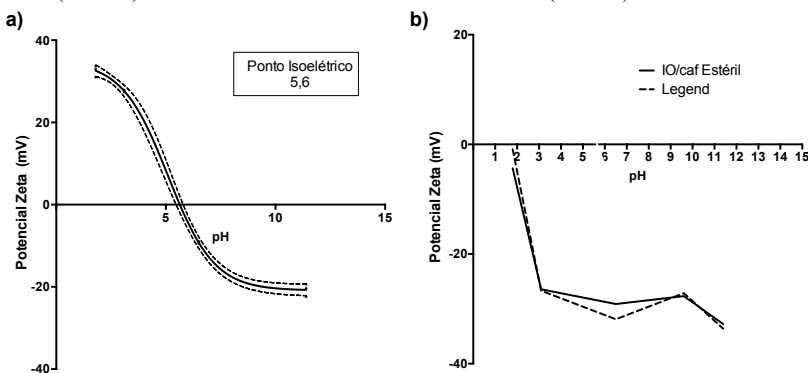


a) Imagens obtidas por TEM, tamanhos de barra de 100 e 50 nm; b) Histograma de distribuição por número obtidos pela técnica de DLS.

Posteriormente, as nanopartículas de óxido de ferro foram caracterizadas quanto a carga superficial por meio da determinação do potencial zeta. A análise pode fornecer informações como o ponto isoelétrico (PI), o qual indica o valor de pH em que as partículas apresentam carga superficial igual a zero. Na Figura 9a é possível observar que as IO-NP apresentaram PI igual a 5,6. Esse achado é importante uma vez que em pH abaixo de 5,6 as nanopartículas

apresentam carga superficial positiva e negativa quando em pH acima de 5,6. O campo eletrostático desenvolvido em torno das IO-NP é capaz de prevenir a aglomeração por meio de repulsão das cargas semelhantes e também indicar o pH ideal de reação para a adição de revestimento (TOMBÁ CZ *et al.*, 2006).

Figura 9: Caracterização da carga superficial das nanopartículas de óxido de ferro (IO-NP) e núcleos revestidos com ácido cafeico (IO-caf).



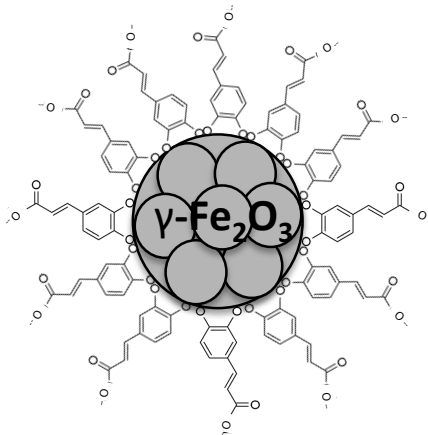
a) Variação da carga superficial das IO-NP e determinação do ponto isoeletrico;
b) Variação da carga superficial dos núcleos IO-caf antes e após esterilização pela autoclave por 20 minutos a 120°C.

A mesma análise para avaliar a influência do pH sobre a carga superficial foi feita com os núcleos de nanopartículas revestidas com ácido cafeico antes e após esterilização em autoclave durante 20 minutos a 120°C. Na Figura 9b é possível observar que na faixa de pH analisada (1,8 – 11,4) os núcleos apresentaram carga superficial negativa. Isto ocorre devido ao revestimento com ácido cafeico, o qual apresenta o grupamento catecol ligado diretamente à nanopartícula de óxido de ferro enquanto que grupo carboxila dissociado fica voltado à superfície, garantindo carga negativa a todo sistema (Esquema 4).

A presença do grupo catecol tem relevância em relação à estrutura/atividade dos ácidos fenólicos, por ser um grupo importante para a complexação com metais (KHOKHAR; OWUSU APENTEN, 2003). Foi demonstrado a relação entre a constante de estabilidade e a ligação em determinado sítio da molécula de ácido cafeico e percebeu-se que em pH acima de 6,5 existe uma preferência de complexação ao grupo catecol, enquanto que, em pH abaixo de 5, há uma competição entre os sítios carboxílico e catecol (CORNARD; CAUDRON;

MERLIN, 2006). Adicionalmente, foi possível verificar a estabilidade do revestimento, uma vez que este não foi desfeito após ser exposto à alta temperatura e valores extremos de pH.

Esquema 4: Esquema ilustrativo sugerido ao núcleo formado pelas nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido cafeico (IO-caf).



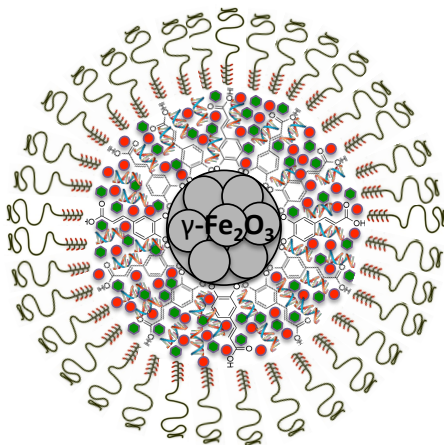
5.3. MONTAGEM DO SISTEMA NANOCARREADOR IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PASp

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro são consideradas uma alternativa segura e eficiente de sistema de entrega de siRNA (ZHANG, JING; LI; HUANG, 2014). Apresentam alta eficiência de internalização à célula alvo, redução de interações não específicas e efeitos colaterais, além da grande vantagem de serem passíveis de orientação após aplicação de campo magnético externo (LAURENT *et al.*, 2014; MODY *et al.*, 2013; MOK; ZHANG, 2013). Da mesma forma, partículas de fosfato de cálcio são amplamente estudadas e utilizadas como sistemas de entrega de ácidos nucleicos em testes *in vitro* (JORDAN; SCHALLHORN; WURM, 1996; PITTELLA *et al.*, 2012; PUDDU *et al.*, 2015). O fosfato de cálcio consiste em um componente inorgânico presente em diferentes tecidos biológicos, desta forma possui excelente biocompatibilidade (ZHANG, MINGZHEN; KATAOKA, 2009). Apresenta também uma síntese fácil e rápida, além da capacidade de encapsular moléculas negativamente carregadas como as de siRNA (PITTELLA *et al.*, 2011). A ampla utilização desse nanocarreador está diretamente ligada à habilidade de dissolver-se rapidamente em pH ácido. Assim, após serem captadas, passam pelo

endossomo e são capazes de liberar o siRNA no citoplasma (ITAKA *et al.*, 2010). Entretanto, o crescimento incontrollável dos cristais de fosfato de cálcio após o preparo das nanopartículas resulta na formação de grandes precipitados, os quais reduzem a eficiência de transfecção (JORDAN; SCHALLHORN; WURM, 1996; MAITRA, 2005). Uma estratégia para contornar este problema é a utilização de estabilizantes na superfície como os blocos de copolímero (KAKIZAWA, YOSHINORI; KATAOKA, 2002).

Este trabalho visou desenvolver um sistema híbrido de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e fosfato de cálcio aproveitando as vantagens individuais de cada carreador para a entrega de siHER2. Nesse sentido, a síntese do sistema carreador foi possível pela técnica de camada por camada (*layer by layer*) em que o núcleo magnético recoberto com ácido cafeico foi protegido por um revestimento de fosfato de cálcio, o qual contém as moléculas de siRNA, e estabilizado por uma camada de bloco de copolímero (Esquema 5). A técnica foi descrita pela primeira vez na década de 60 (ILER, 1966; KIRKLAND, 1965) e foi selecionada para este trabalho por ser altamente versátil uma vez que as interações eletroestáticas possibilitam a utilização de uma ampla variedade de materiais, além de ser um procedimento rápido, simples e barato (YONAM; WU; JONATHAN, 2014).

Esquema 5: Esquema ilustrativo sugerido às nanopartículas IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp.



Tem sido demonstrado em testes *in vitro*, de cultura celular, que o tamanho, a forma e a carga superficial das nanopartículas são parâmetros importantes diretamente relacionados com a capacidade e efetividade de internalização das partículas nas células (GRATTON *et al.*, 2008; LI, YAN; CHEN; GU, 2012; ZHU *et al.*, 2012). Além disso, na literatura tem-se relatado que nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio e bloco de copolímero apresentam taxa de incorporação de siRNA inversamente proporcional à concentração de bloco de copolímero, ou seja, quanto menor a concentração de bloco de copolímero utilizada na formulação, maior a concentração de siRNA incorporada nas nanopartículas (KAKIZAWA, Y. *et al.*, 2004; KAKIZAWA, YOSHINORI; KATAOKA, 2002).

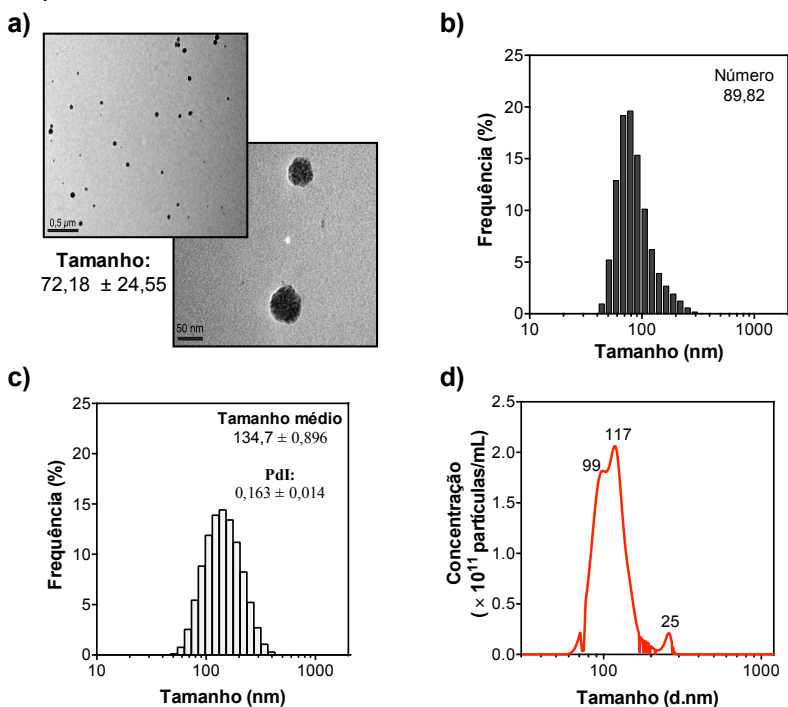
Neste sentido, foi feita a avaliação da formulação a partir da síntese de nanopartículas com diferentes concentrações de bloco de copolímero PEG-PAsp. As partículas foram caracterizadas quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão e eficiência de incorporação de siHER2. Percebeu-se que a concentração do bloco de copolímero não promovia alterações expressivas tanto no tamanho quanto na eficiência de incorporação de siRNA. Visto que se almeja desenvolver um nanocarreador para posterior aplicação *in vivo* é aconselhável uma maior concentração da porção de polietilenoglicol (PEG) na superfície do sistema. Uma vez que o PEG por apresentar propriedades hidrofílicas e neutras garante uma maior estabilidade coloidal e maleabilidade ao sistema, assim como reduz a adsorção de proteínas e imunogenicidade favorecendo um maior tempo de circulação (GU *et al.*, 2012; JEONG; PARK; KIM, 2011; KATAOKA; HARADA; NAGASAKI, 2001). Desta forma, as nanopartículas sintetizadas com 800 µg/mL de bloco de copolímero PEG-PAsp foram selecionadas por apresentarem uma distribuição homogênea, um tamanho adequado para um nanocarreador além de apresentar alta eficiência de incorporação de siRNA. Os dados obtidos para todas as amostras analisadas estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3: Dados referentes às IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp sintetizadas com diferentes concentrações de bloco de copolímero PEG-PAsp.

Concentração de PEG-PAsp (µg/mL)	Tamanho médio por intensidade	Índice de polidispersão	% de siRNA incorporado
1000	140,8	0,198	94
800	121,0	0,142	96
600	125,0	0,304	92
400	111,8	0,130	96
200	173,3	0,256	94

A caracterização das nanopartículas IO-*caf*@CaP/siHER2/PEG-PAsp quanto a morfologia por microscopia eletrônica de transmissão permitiu verificar um formato predominantemente arredondado além de uma distribuição de diâmetro médio, obtida por meio do software *ImageJ*®, igual a 71 nm. Interessante destacar a presença de diversas partículas elétron-densas formando o núcleo do sistema. Esse achado sugere que as IO-*caf* sejam formadas por mais de uma IO-NP (Figura 10a).

Figura 10: Caracterização de tamanho e forma das IO-*caf*@CaP/siHER2/PEG-PAsp.



a) Imagens obtidas por TEM, com tamanho de barra de 500 e 50 nm; Histograma de distribuição média por número (b) e por intensidade (c) obtidos pela técnica de DLS; d) Histograma de distribuição de frequência de tamanho por intensidade, obtido pela NTA.

O formato esférico é encontrado na maior parte dos sistemas de entrega desenvolvidos para a terapia anticâncer. Porém, em contraste, os vírus e as bactérias apresentam diferentes formas e conseguem carrear e

entregar de forma efetiva o material genético, além de evitar o reconhecimento pelo sistema imune (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; TRUONG *et al.*, 2014). Deste modo, estudos relacionados à morfologia dos carreadores são necessários, uma vez que são destinados à diferentes tipos de células, além de que devem ser capazes de chegar ao sítio ativo quando aplicados *in vivo*.

Posteriormente, o sistema carreador IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp foi caracterizado por DLS em que observou-se um diâmetro hidrodinâmico médio de $134,70 \pm 0,90$ nm e PDI de $0,163 \pm 0,014$ (Figura 10c) obtido a partir do histograma de distribuição de tamanho por intensidade de luz espalhada. Da mesma forma ao descrito para os núcleos de IO-Caf, a diferença observada nos tamanhos obtidos pelas duas técnicas deve-se ao fato de que a análise por intensidade feita por DLS leva em consideração a presença de compostos orgânicos na superfície e efeitos de solvatação que influenciam na intensidade de luz espalhada pelas nanopartículas. Em contrapartida, por TEM, considera-se apenas os núcleos mais elétron-densos de óxido de ferro e CaP. Entretanto, a distribuição de tamanho obtida por DLS, por número, mostrou um pico de tamanho médio em torno dos 89 nm, que tem boa correlação com os dados obtidos na microscopia eletrônica (Figura 10b).

Adicionalmente, a Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) proporcionou uma medida com alta resolução uma vez que as partículas são avaliadas em suspensão de forma individual, permitindo a detecção de picos secundários além de fornecer a concentração aproximada da formulação, o que não acontece pelo Zetasizer Nano ZS (FILIPE; HAWES; JISKOOT, 2010; ROURSGAARD *et al.*, 2014). Usando a NTA as IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp apresentaram um histograma de distribuição com diâmetro médio de 124,5 nm (Figura 10d) assim como concentração de $6,49 \times 10^{12}$ nanopartículas/mL. O tamanho foi discretamente menor ao encontrado por DLS, porém compatível com o descrito na literatura (FILIPE; HAWES; JISKOOT, 2010; HOLE *et al.*, 2013). A Tabela 4 sumariza os valores de diâmetro médio obtidos pelas diversas técnicas utilizadas para caracterização do tamanho das nanopartículas, e como mencionado anteriormente, os diferentes valores estão relacionados às diferentes técnicas e diferentes formas de análise (intensidade e número).

Tabela 4: Valores de tamanho médio obtidos por diferentes técnicas para a IO-
caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp

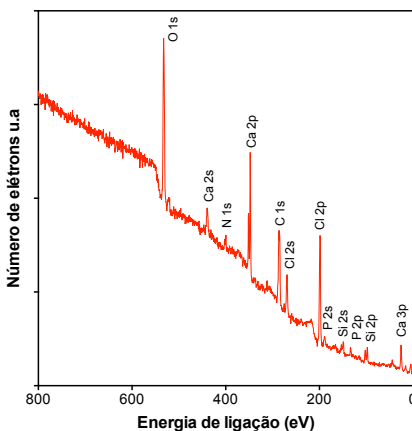
Técnica	NTA	DLS		TEM
	Intensidade	Intensidade	Número	Número
Tamanho médio (nm)	124,5	134,7		71,18
Pico de distribuição (nm)			89,82	

Sistemas de entrega similares formados por um núcleo magnético revestido com CaP e bloco de copolímero, encontrados na literatura, apresentaram tamanho médio por intensidade semelhantes, $130,0 \pm 27,8$ nm e $134,5 \pm 14,3$ nm (DALMINA, 2015). Pesquisas sugerem que partículas utilizadas como carreadores devem apresentar um tamanho na faixa 20 e 200 nm, desta forma, são grandes o suficiente para evitar a filtração renal e pequenas o bastante para atravessar a membrana celular (DAVIS; CHEN; SHIN, 2008). Neste sentido, existem estudos que afirmam que nanopartículas apresentam uma maior captação celular do que micropartículas. Além disto, foi demonstrado que partículas com tamanho de 100 nm apresentaram 2,5 e 6 vezes maior internalização do que as de 1 μ m e 6 μ m, respectivamente, em linhagem celular humana de adenocarcinoma de cólon Caco-2 (DESAI *et al.*, 1997).

Finalmente, quando analisadas quanto à carga superficial, as IO-
caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp apresentaram um potencial zeta próximo a neutralidade, $-3,06 \pm 0,185$ mV. Esta propriedade sugere que as nanopartículas são estabilizadas estericamente devido à presença do bloco PEG do bloco de copolímero PEG-PAsp, o qual garante também características neutras e hidrofílicas à superfície do sistema (GU *et al.*, 2012; ZHANG, MINGZHEN; KATAOKA, 2009). A carga superficial influencia diretamente no mecanismo de internalização celular. Partículas neutras são captadas pelo simples mecanismo de endocitose/pinocitose, já as positivamente carregadas internalizam por endocitose mediada por clatrina, enquanto que as negativamente carregadas são por endocitose mediada por caveolina, ambas proteínas presentes na membrana celular (YAMEEN *et al.*, 2014). Por outro lado, estudos afirmam que partículas neutras apresentam uma reduzida opsonização e interação com proteínas presentes no soro favorecendo o não reconhecimento pelo sistema imune e maior tempo de circulação após administração intravenosa *in vivo* (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009).

A fim de caracterizar a composição química elementar das IO-*caf*@CaP/siHER2/PEG-PAsp utilizou-se a espectroscopia de emissão de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), uma técnica analítica amplamente utilizada para a caracterização de superfícies (FEWSTER, 2014). Um espectro de fotoemissão é apresentado na Figura 11, onde observam-se picos relativos aos elementos oxigênio, nitrogênio e carbono, possivelmente referentes ao óxido de ferro e PEG-PAsp, assim como cálcio e fósforo, relativos à camada de fosfato de cálcio. Evidenciou-se também um pico relativo ao átomo de cloro, o qual pode ser indicador de uma purificação incompleta, uma vez que o cloreto de cálcio é utilizado para a deposição da camada de fosfato de cálcio do sistema. A ausência do elemento ferro, relacionado ao núcleo de óxido de ferro, pode ser explicada pela não utilização da técnica de pulverização catódica (sputtering). A técnica consiste no bombardeamento da amostra com átomos e íons responsáveis pela erosão da mesma, a fim de facilitar a identificação dos elementos presentes em todas as camadas da amostra (OHRING, 1992). Desta forma, a análise não foi capaz de penetrar a camada mais interna da estrutura das IO-*caf*@CaP/siHER2/PEG-PAsp.

Figura 11: Espectro de fotoemissão de filmes de IO-*caf*@CaP/siHER2/PEG-PAsp obtido por XPS.

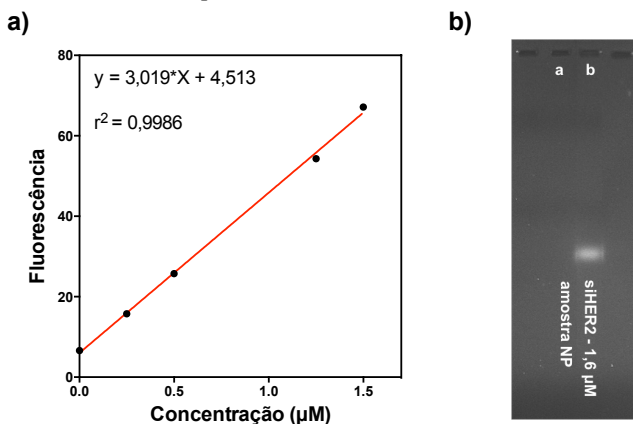


IO-*caf*@CaP/siHER2/PEG-PAsp foram purificadas utilizando o dispositivo de ultrafiltração (*Vivaspin*TM 500) e depositadas sobre substrato de silício, na faixa de energia de ligação de 0 – 800 eV.

Idealmente, um sistema carreador deve proteger as moléculas de siRNA dos ambientes extra e intracelular além de ser capaz de levar uma quantidade suficiente às células a fim de garantir o efeito de interferência (KAKIZAWA; FURUKAWA; KATAOKA, 2004; XU, CONG-FEI; WANG, 2014). A concentração de siRNA incorporada nas IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp foi determinada por meio do kit *Quant-iT[®] microRNA Assay*. O kit possui um reagente capaz de intercalar à dupla fita de RNA emitindo fluorescência. Desta forma, a quantidade de RNA presente na amostra será diretamente proporcional à intensidade de fluorescência emitida. O ensaio garante alta sensibilidade e especificidade, uma vez que não sofre interferência de nucleotídeos livres ou outros contaminantes. A partir de uma curva padrão de siHER2 obteve-se a equação da reta ($y=3,019*x+4,513$), na qual as fluorescências foram interpoladas e a eficiência de incorporação foi calculada, ficando na faixa de 87 a 99% (Figura 12a).

De maneira complementar, foi realizada a eletroforese em gel de agarose. Na Figura 12b é possível observar a imagem do gel no qual não foi detectada nenhuma banda correspondente ao siHER2 no sobrenadante das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp sugerindo que todo ou praticamente todo siHER2 adicionado à formulação tenha sido incorporado. O limite de detecção do método é de aproximadamente 3 μM de siRNA (LONZA, 2010).

Figura 12: Avaliação da eficiência de incorporação de siRNA às IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp.

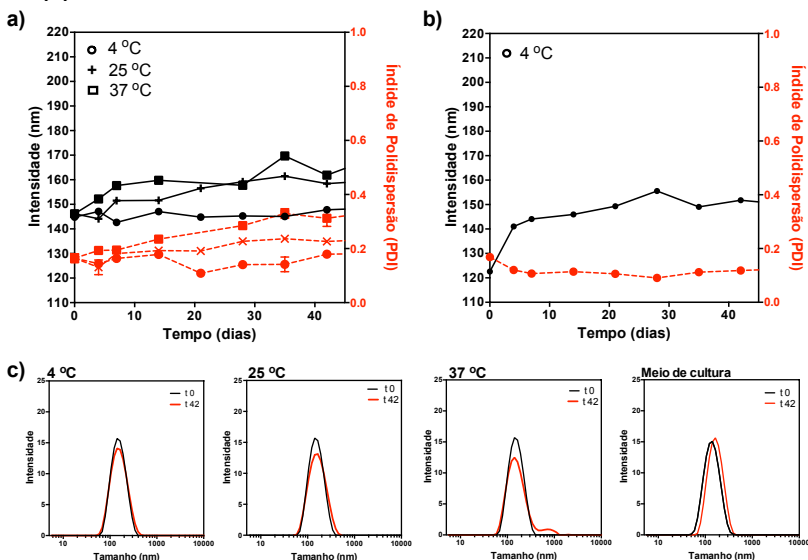


a) Curva padrão de siHER2 obtida pelo kit comercial; b) Sobrenadante das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp foi adicionado na faixa (a) enquanto que na faixa (b) foi aplicado o controle de *siHER2 naked* na concentração de 1,6 μM .

No desenvolvimento de qualquer produto farmacêutico, deve-se realizar estudos para verificar a manutenção das propriedades físicas e químicas. Tais estudos visam estabelecer o tempo de meia-vida, período de utilização em embalagem e condições de estocagem mais apropriada do produto (OLIVEIRA; YOSHIDA; LIMA GOMES, 2011). Neste contexto, a próxima etapa foi avaliar a estabilidade coloidal relacionada ao tamanho e índice de polidispersão das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp. Para isso, as nanopartículas foram armazenadas em três temperaturas, tal como preparadas, assim como em contato com meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB (para garantir a integridade do sistema nos testes *in vitro*) durante 42 dias. Observa-se na Figura 13 que as IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp mostraram-se estáveis em todas as temperaturas testadas, isto é, as variações de tamanho médio e índice de polidispersão foram mínimas. Contudo, a temperatura de armazenamento na qual as propriedades avaliadas foram melhor conservadas foi a de 4°C (Figura 13a). O mesmo resultado foi obtido para as IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp armazenadas em meio de cultura (Figura 13b). A análise sobre a variação de tamanho também pode ser observada na Figura 13c, na qual estão representados os histogramas de distribuição de tamanho médio por intensidade comparando o tempo zero e após 42 dias de armazenamento, em todas as condições avaliadas. A partir das distribuições é possível observar que as nanopartículas armazenadas a 4°C não apresentaram variações significativas no tamanho e índice de polidispersão, entretanto, pequenas mudanças começam a ser observadas a 25°C e acentuaram-se a 37°C.

A estabilidade coloidal exibida pode ser explicada pela carga superficial neutra, hidrofiliicidade e alta mobilidade superficial proporcionada pelo PEG que conferem boa estabilidade estérica às nanopartículas (GU *et al.*, 2012). Além disso, o revestimento com polímero confere uma melhor evasão do sistema imunológico, aumentando o tempo de circulação, propriedade importante para aplicação *in vivo* (LAURENT *et al.*, 2014).

Figura 13: Avaliação da estabilidade coloidal das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp por DLS.

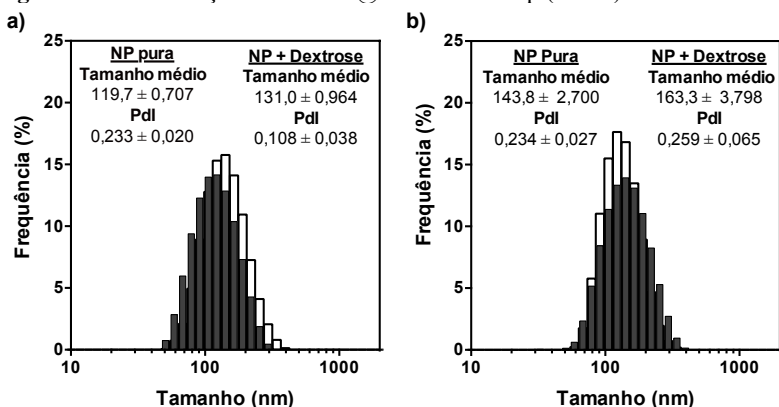


a) Medidas de DLS, no período de 42 dias e em diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C) da suspensão de IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp; b) Medidas de DLS, no período de 42 dias, na temperatura de 4 °C das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp em contato com meio de cultura RPMI suplementado com 20% SFB; c.) Histogramas de tamanho referente ao tempo 0 (preto) e 42 dias (vermelho) nas temperaturas de 4, 25 e 37 °C da suspensão de IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp como preparada e em contato com meio de cultura RPMI suplementado com 20% SFB.

Sabendo que a estabilidade do sistema carreador foi conservada a 4 °C planejou-se utilizar a liofilização, uma operação unitária de secagem amplamente utilizada na indústria farmacêutica; consiste na completa remoção da água após congelamento da amostra seguida de evaporação por sublimação (ABDELWAHED *et al.*, 2006; FRANKS, 1998). No entanto, durante a liofilização podem ocorrer diferentes tipos de estresse e degradação da estrutura, acarretando à desestabilização das nanopartículas. Desta forma, a utilização de estabilizadores/crioprotetores como dextrose, lactose entre outros, podem contribuir e diminuir os efeitos indesejados da liofilização (NIREESHA *et al.*, 2013). Para isto, suspensões contendo nanopartículas sem siHER2, IO-caf@CaP/PEG-PAsp (Mock), foram

lioofilizadas sem e com adição de crioprotetor (10% de dextrose). Na Figura 14, é possível observar os histogramas de distribuição de tamanho por intensidade das amostras antes e após a operação, assim como os valores de tamanho médio e índice de polidispersão. Percebe-se que em ambas as situações não houve alteração significativa, além de que a adição do crioprotetor parece não ser necessária, visto que a amostra sem os 10% de dextrose mantiveram as características iniciais, sugerindo que o bloco de copolímero PEG-PAsp seja eficiente em suportar o estresse da liofilização.

Figura 14: Liofilização das IO-caf@CaP/PEG-PAsp (Mock).



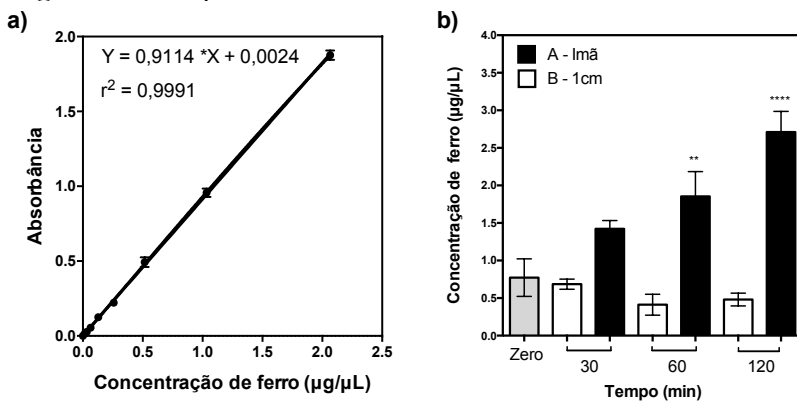
Histogramas de distribuição de tamanho por intensidade das nanopartículas sem siRNA antes (a) e após (b) processo de liofilização. Sendo que as colunas em preto são referentes a suspensão de nanopartículas assim como preparada e as em branco a suspensão com 10 % de dextrose como crioprotetor.

As nanopartículas superparamagnéticas (spions) apresentam uma característica bastante interessante que é a capacidade de responder à aplicação de um campo magnético externo (PARK *et al.*, 2010). Desta forma, a utilização das spions como sistemas de entrega torna-se bastante promissora, uma vez que podem ser facilmente direcionadas ao sítio ativo.

Sabendo-se que o revestimento da superfície das nanopartículas de óxido de ferro pode diminuir a magnetização devido à saturação das nanopartículas, foi realizado um estudo para avaliar a resposta e capacidade de migração das IO-caf@CaP/PEG-PAsp frente a um campo magnético externo.

Neste sentido, o estudo de responsividade ao campo magnético fornece informações capazes de evidenciar a vetorização das IO-*caf@CaP/PEG-PAsp*. Para isso, utilizou-se um dispositivo próprio e após a aplicação do campo magnético, em diferentes tempos, a quantificação de ferro foi feita por meio do método de ferrozine. O teor de ferro foi obtido a partir da interpolação dos valores correspondentes as amostras em uma curva padrão (Figura 15a). Na Figura 15b é possível observar que com a aplicação de campo magnético externo a concentração de ferro quantificada no ponto mais próximo ao ímã aumenta de forma dependente do tempo, ou seja, quanto maior o tempo de exposição ao ímã, maior quantidade de partículas aproximam-se da fonte magnética.. É interessante destacar que o aumento nas concentrações de ferro detectado na região A, ocasionou consequentemente, uma redução na região B. Isto indica que as IO-*caf@CaP/PEG-PAsp* são facilmente guiadas em direção ao campo magnético. Quando as amostras são comparadas com o tempo zero, sem aplicação do campo magnético, o aumento mostrou-se estatisticamente significativo a partir dos 60 minutos.

Figura 15: Estudo de responsividade ao campo magnético das IO-*caf@CaP/PEG-PAsp*.



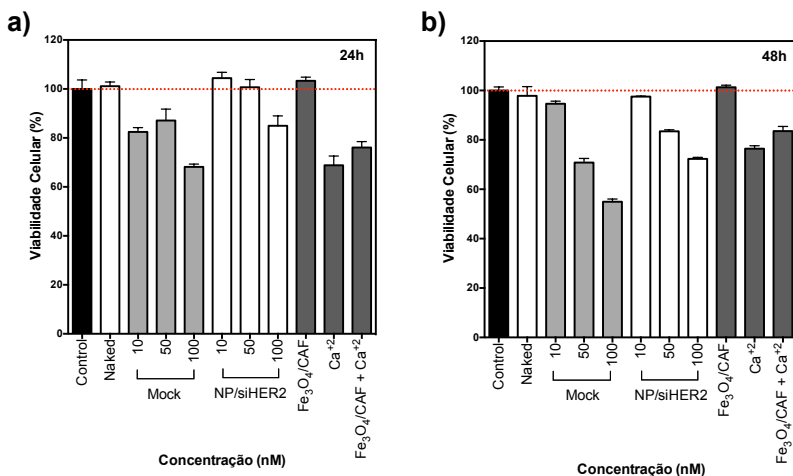
a) Curva padrão utilizada para quantificação de ferro pelo método de ferrozine; b) Quantificação de ferro referente às IO-*caf@CaP/PEG-PAsp* nos pontos A (próximo ao ímã) e B (afastadas 1 cm do ímã) após aplicação de campo magnético externo durante diferentes tempos. Os valores foram expressos como média ± EPM ($n=6$). Para análise estatística foi utilizado one-way ANOVA, seguido do teste de Dunnet. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, comparando com o controle (tempo zero).

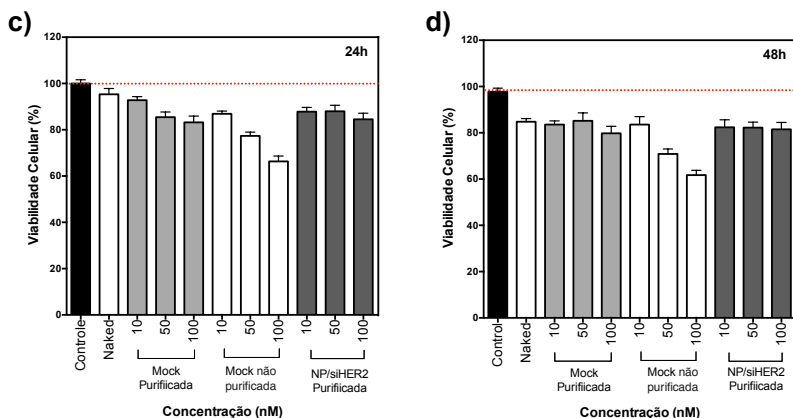
A segurança e eficácia dos nanocarreadores são fundamentais a fim de garantir o sucesso da terapia de RNA de interferência. Desta forma, testes relacionados à toxicidade da formulação são fundamentais para a aplicação tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

A presença de íons em concentrações aumentadas podem alterar a homeostasia tanto das células como de todo um organismo caso sejam aplicados sistemicamente (WINKLER; HOFF; SMITH, 1940). Nesse sentido, as suspensões de IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp foram previamente purificadas utilizando um dispositivo de ultrafiltração (*VivaSpin™ 500* – MWCO:10 kDa) para todas as análises *in vitro*. Tal cuidado foi tomado após a constatação da presença de interferentes, principalmente de íons cálcio na formulação (Figura 16). Além disto, a solução de tratamento de 100 nM de IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp apresentava uma concentração de cálcio (5,6 mM) aproximadamente 6 vezes maior do que a concentração fisiológica do ambiente extracelular (1 mM) (VINBERG; KOSKELAINEN, 2010).

Com o ensaio de MTT foi possível verificar que a citotoxicidade encontrada inicialmente era um resultado falsamente positivo devido à presença de interferentes na suspensão das nanopartículas não purificadas e não devido à formulação do nanocarreador.

Figura 16: Avaliação da citotoxicidade na suspensão de IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp e dos componentes utilizados para a síntese.

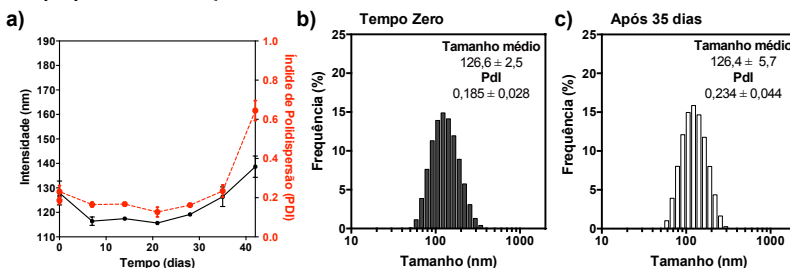




Avaliação da citotoxicidade, pelo ensaio de MTT, das nanopartículas sem siRNA (Mock), IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp (NP/siHER2) e soluções utilizadas para a síntese, na linhagem celular HCC1954 após 24 (a) e 48 horas (b) de tratamento. Da mesma forma, (c) e (d) apresentam a avaliação da citotoxicidade das nanopartículas brancas (Mock) não purificadas e purificadas além das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp (NP/siHER2) purificadas após 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente.

Como controle de qualidade, análises de DLS durante o intervalo de 42 dias de armazenamento a 4°C foram realizadas, a fim de verificar a integridade das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp após o processo de purificação por ultrafiltração. Nos dados demonstrados na Figura 17, observa-se pouca variação de tamanho médio e de PDI até 35 dias. Porém, existe uma leve tendência de aumento do tamanho a partir do dia 21, o qual torna-se bastante expressivo aos 42 dias de armazenamento. Esse aumento pode ser devido à formação de agregados secundários, uma vez que íons livres na suspensão, possíveis estabilizantes da formulação, foram removidos. Comportamento parecido foi observado por outros autores após purificarem, com dispositivo semelhante, nanopartículas de fosfato de cálcio contendo siRNA e revestimento de bloco de copolímero (PITTELLA *et al.*, 2012).

Figura 17: Avaliação da estabilidade coloidal das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp após ultrafiltração.

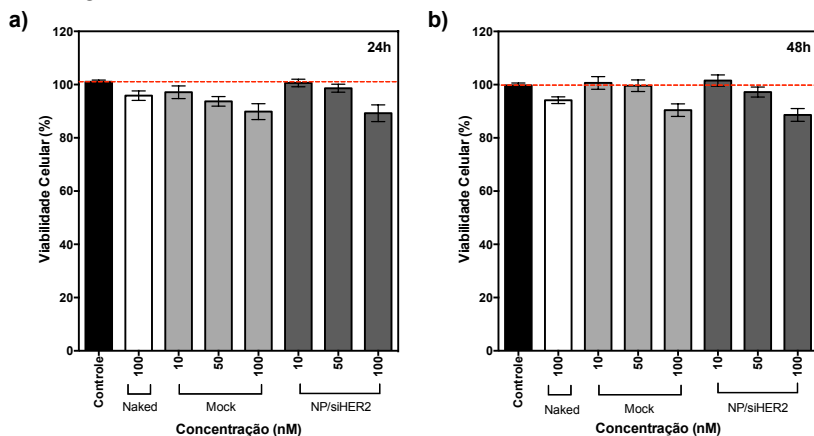


a) Análise de DLS para avaliar a estabilidade da suspensão de IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp; Histograma de distribuição média por intensidade referente ao tempo 0, antes da purificação em (b) e após purificação e 35 dias de armazenamento a 4°C em (c), obtidos pela técnica de DLS.

5.4. ANÁLISES *IN VITRO* - INTERAÇÕES NA INTERFACE CÉLULAS - IO-CAF@CAP/siHER2/PEG-PAsp

As análises *in vitro* iniciaram-se com a avaliação da citotoxicidade da formulação à linhagem celular de câncer de mama HER-2 positivo HCC1954. Na Figura 18 observa-se os resultados das análises feitas com as nanopartículas IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp previamente purificadas. Percebe-se que mesmo após 48 horas e nas concentrações mais elevadas de siRNA e consequentemente de partículas, as mesmas não apresentaram toxicidade significativa às células de câncer de mama HER-2 positivo. Biocompatibilidade semelhante foi relatada por outros autores, os quais desenvolveram nanopartículas de fosfato de cálcio e bloco de copolímero em linhagem celular de adenocarcinoma pancreático (PITTELLA *et al.*, 2012). Como controles foram utilizadas a molécula de siRNA livre (*siHER2 naked*) e as nanopartículas sem siRNA (Mock).

Figura 18: Avaliação da citotoxicidade das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp na linhagem celular HCC1954.



Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT na linhagem celular HCC1954 após 24 (a) e 48h (b) com os tratamentos em concentrações crescentes de siRNA. No controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. Cada barra representa a média \pm EPM ($n=3$). Para análise estatística foi utilizado one-way ANOVA, seguido do teste de Dunnet.

É importante destacar que a segurança e eficácia dos nanocarreadores são fundamentais a fim de garantir o sucesso da terapia por RNA de interferência. Neste sentido, ao avaliar separadamente o potencial citotóxico dos componentes do sistema IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp, a literatura relata que as nanopartículas magnéticas são amplamente empregadas na área biomédica principalmente devido a alta biocompatibilidade e baixa toxicidade (MAHMOUDI, *et al.*, 2011). Os óxidos de ferro após inseridos em compartimentos do organismo serão dissolvidos em baixo pH para utilização de seus átomos em processos fisiológicos. Por sua vez, o fosfato de cálcio é um componente inorgânico presente em diversos tecidos do organismo como ossos, dentes e tendões, sendo então, altamente biocompatível (ZHANG; KATAOKA, 2009). Por fim, a utilização de blocos de copolímero contendo o bloco inerte de PEG e bloco de poli aspartato também apresentam compatibilidade com vários órgãos e tecidos e são utilizados como nutrientes após degradação da molécula.

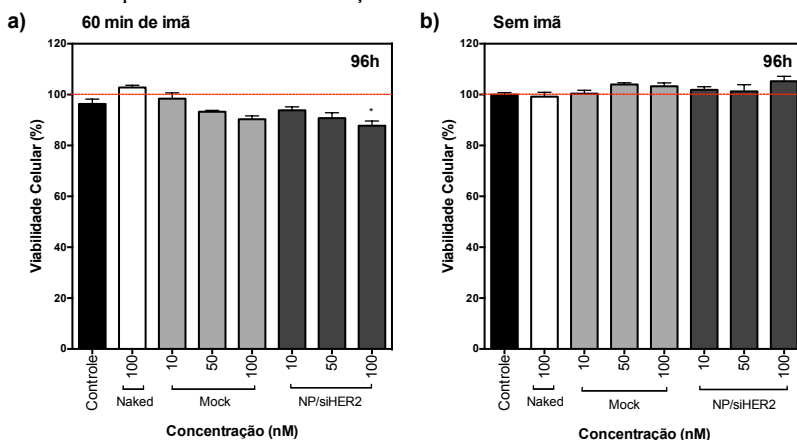
A superexpressão da proteína HER-2 resulta em uma constante ativação do receptor, o que estimula diversos sinais associados

principalmente com o crescimento, sobrevivência e migração celular, além de ativar as via RAS/MAPK, PI3K/AKT e impedir a sinalização de morte celular (KÜMLER; TUXEN; NIELSEN, 2014; LIU, DAN *et al.*, 2013; LIU, KUN *et al.*, 2014; MAY; FELICITY; MAY, 2014).

Estudos presentes na literatura mostram uma significativa diminuição da proliferação das linhagens SK-BR-3, MCF-7 após 96 horas da transfecção de siRNA anti-HER-2, quando comparadas com o controle (FALTUS *et al.*, 2004). Neste sentido, a avaliação da proliferação celular utilizando o ensaio de MTT foi realizado com a linhagem HCC1954, após 96 horas de incubação com as nanopartículas. Os tratamentos foram feitos com concentrações crescentes de IO-*caf*@CaP/siHER2/PEG-PAsp e de nanopartículas sem siRNA (Mock), assim como *siHER2 naked*. A avaliação foi feita com e sem aplicação de campo magnético externo de 60 minutos.

Na Figura 19 observa-se que em ambas as análises, com e sem aplicação de imã, não foram verificadas alterações na proliferação celular, mesmo na concentração mais elevada de nanopartículas e siHER2. Entretanto, vale salientar que embora a proliferação não tenha sido detectada, o sistema é capaz de gerar um silenciamento de aproximadamente 40% quando avaliado do qRT-PCR (Figura 23).

Figura 19: Avaliação da proliferação celular por MTT na linhagem células HCC1954 após 96 horas de incubação.



Avaliação da proliferação celular pelo ensaio de MTT na linhagem celular HCC1954. a) Tratamentos em concentrações crescentes de siRNA sofreram estímulo magnético durante 60 min e em seguida o meio de cultura foi trocado e as células incubadas por 96h na estufa; b) Tratamentos em concentrações

crescentes de siRNA durante 96h, sem estímulo magnético. No controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. Cada barra representa a média \pm EPM (n=1). Para análise estatística foi utilizado one-way ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

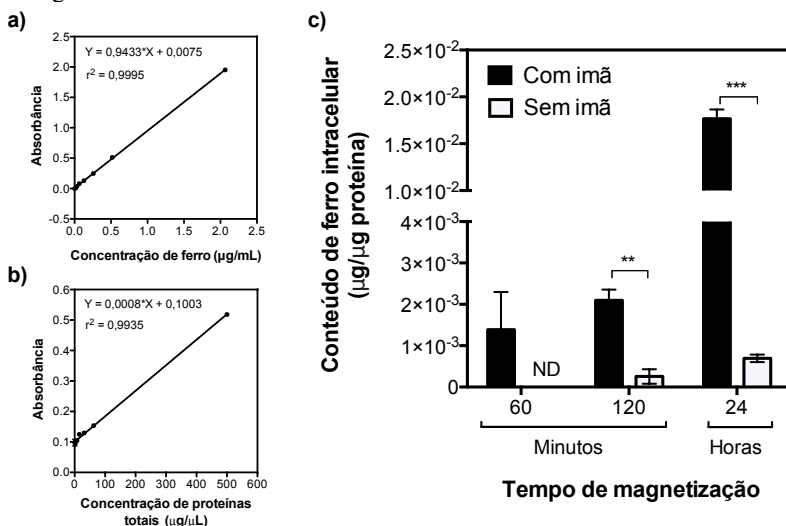
5.4.1 Captação celular das IO-*caf*@CaP/siHER2/PEG-PAsp

Nanopartículas magnéticas apresentam grande potencial para diversas aplicações biomédicas porém, otimizar a eficiência de captação destas estruturas pelas células é uma etapa bastante crítica (ZHU *et al.*, 2012). Tanto o tamanho quanto a forma e a carga superficial estão diretamente relacionados e podem alterar a endocitose das nanopartículas (MAHMOUDI, M. *et al.*, 2009). Neste contexto, a captação das IO-*caf*@CaP/siHER2/PEG-PAsp pela linhagem celular HCC1954 foi avaliada por diferentes técnicas.

A captação das nanopartículas foi inicialmente avaliada por meio da quantificação de ferro intracelular antes e após o tratamento. Amplamente utilizado para a determinação de ferro em amostras biológicas, o método de ferrozine possui um reagente conhecido por ser um eficiente quelante de íons ferrosos (Fe^{+2}) (CERIOTTI; CERIOTTI, 1980; FISH, 1988; SUN *et al.*, 2013). A quantificação baseia-se na capacidade do reagente ferrozine de formar um complexo colorido ao ligar-se aos íons ferrosos, que apresentam alta absorção em 550 nm (RIEMER *et al.*, 2004).

Para o ensaio, as células HCC1954 foram incubadas com 100 nM de nanopartículas (2,10 μg de ferro) durante 60 e 120 minutos além de 24 horas. Na Figura 20c é possível observar que a captação das nanopartículas foi dependente do tempo, ou seja, quanto maior tempo de interação nanopartícula-célula, maior captação. De maneira semelhante, outros autores também relatam a captação de nanopartículas magnéticas de forma dependente do tempo para as análises com e sem força magnética externa (LAMKOWSKY *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2013). Além disso, a quantificação feita na presença de campo magnético, foi consideravelmente maior do que na ausência, evidenciando o potencial de vetorização e resposta a magnetização apresentado pelas nanopartículas IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp.

Figura 20: Método de ferrozine para quantificação de ferro intracelular na linhagem celular HCC1954.



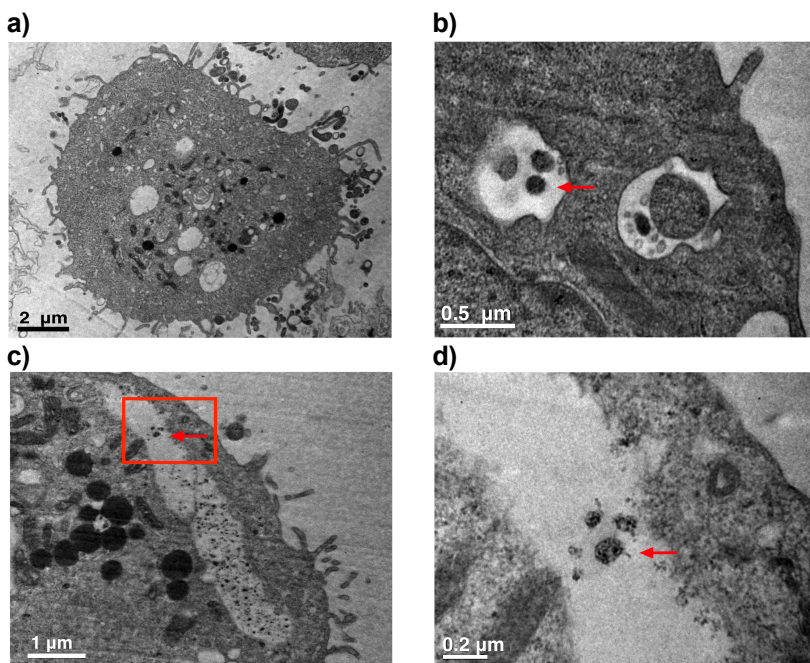
a) Curva padrão referente ao método de ferrozine; b) Curva padrão da quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry; c) Quantificação de ferro intracelular nas células HCC1954, normalizada pela quantidade de proteínas totais, em diferentes tempos de exposição ao campo magnético. Cada barra representa a média \pm EPM ($n=3$). Para análise estatística foi utilizado teste t. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Existem dois mecanismos possíveis para as nanopartículas entrarem nas células: um dependente de energia (endocitose) e outro independente de energia (captação passiva por simples difusão na membrana celular) (LI, TIANSHU; TAKEOKA, 2014; SAFI *et al.*, 2011). A endocitose compreende a pinocitose, a endocitose mediana e a fagocitose. A pinocitose consiste na absorção de fluídos e moléculas dentro de pequenas vesículas por todos os tipos de células (DING; MA, 2012; YAMEEN *et al.*, 2014). A endocitose mediada depende da interação com proteínas específicas (clatrina e caveolina) presentes na membrana celular (YAMEEN *et al.*, 2014). A fagocitose, por sua vez, representa um processo em que a célula capta moléculas maiores, geralmente realizada por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (ADEREM; UNDERHILL, 1999). Entretanto, cada mecanismo de captação necessita de proteínas e sinais intracelulares sendo então específicos para cada tipo celular (KUHN *et al.*, 2014). O conhecimento sobre o mecanismo de captação da célula alvo oferece diversas

informações para o desenvolvimento de carreadores com maior direcionamento intracelular proporcionando melhores resultados terapêuticos (YAMEEN *et al.*, 2014).

Para um possível mecanismo de internalização das nanopartículas desenvolvidas neste trabalho utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para isto, as células HCC1954 foram avaliadas por TEM após serem incubadas com 100 nM de IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp durante 24 horas (Figura 21).

Figura 21: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da linhagem HCC1954 incubadas com as IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp.



a) Células controle; (b) e (c) Células tratadas apresentando vesículas endocíticas/pinocíticas contendo nanopartículas no seu interior; d) Magnificação de área destacada da figura c.

Células controle incubadas com meio de cultura sem nanopartículas apresentaram densidade eletrônica normal em todas as estruturas celulares, e nenhuma partícula elétron-densa foi encontrada (Figura 21a). Entretanto, células incubadas com as nanopartículas apresentaram vesículas de diversos tamanhos contendo partículas

elétron-densas (Figura 21b,c). Interessante destacar que nenhuma nanopartícula foi encontrada no citoplasma celular ou em outras organelas. O achado também sugere que a captação das IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp possivelmente ocorra por um processo dependente de energia, como as vesículas pinocíticas.

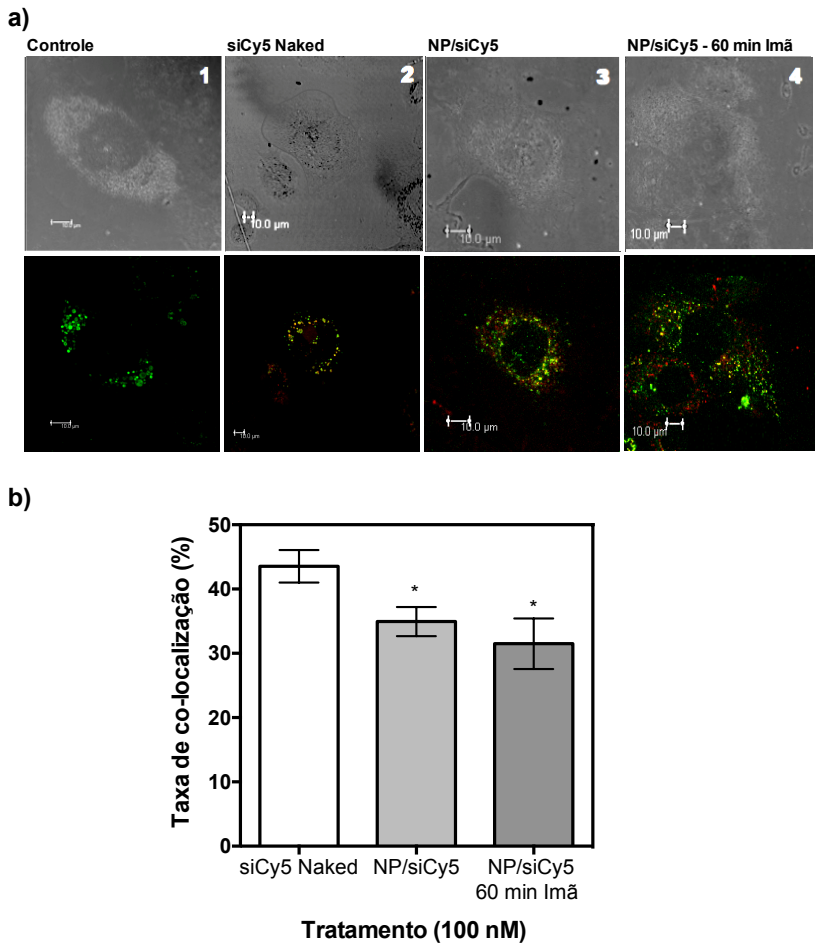
De maneira complementar, foi realizada a observação do tráfego intracelular por microscopia confocal. A Figura 22 apresenta as imagens obtidas neste ensaio, em que os endossomos/lisossomos estão marcados pelo fluoróforo LysoTrackerGreen DND-26, e aparecem em verde, enquanto que as moléculas de siRNA estão conjugadas com cianina 5 (Cy5), a qual proporciona coloração vermelha. Por sua vez, os pontos amarelos, correspondem a co-localização de ambas as marcações (pixels vermelhos e verdes). Sendo assim, no controle é possível observar apenas a marcação verde (endossomos/lisossomos) enquanto nos tratamentos é possível observar as três colorações (verde, vermelho e amarelo).

Existem duas etapas cruciais que devem ser superadas para garantir a eficiência do efeito de RNA de interferência *in vitro*. A primeira consiste em carrear a molécula de siRNA ao interior da célula alvo de forma segura e a segunda, proporcionar o escape endossomal a fim de evitar a degradação da molécula de siRNA no baixo pH dos lisossomos, permitindo que o siRNA chegue ao citoplasma celular (KIM *et al.*, 2014; PITTELLA; KATAOKA, 2013). Tanto nas imagens quanto no gráfico mostrado na Figura 22b, observa-se uma taxa de co-localização significativamente maior no tratamento do siCy5 *naked* quando comparado com os tratamentos que utilizaram as nanopartículas (com ou sem imã) para o carregamento da molécula. Isso ocorre pois a molécula de siRNA livre não apresenta mecanismos que proporcionem o escape endossomal. Desta forma, o siRNA será degradado pelo pH ácido do interior da organela resultando em baixa eficiência do efeito de RNAi (WANG *et al.*, 2010).

Por outro lado, a alta concentração de íons cálcio presente nas nanopartículas faz com que o influxo de água para o interior do endossomo/lisossomo aumente, promovendo a solubilização lenta da camada de fosfato de cálcio. Assim, devido ao aumento da pressão osmótica ocorre a ruptura da membrana da organela (PITTELLA *et al.*, 2011). Desta forma, a estrutura da IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp promoverá o rompimento do endossomo/lisossomo proporcionando o escape endossomal e consequentemente liberando o siHER2 no citoplasma celular. O siRNA livre no citoplasma estará pronto para

ligar-se ao complexo RISC e agir interferindo na expressão da proteína alvo.

Figura 22: Análise da captação celular das IO-Caf@CaP/siCy5/PEG-PAsp por microscopia confocal.



a) Imagens das células de câncer de mama HER-2 positivo HCC1954, coluna (1) células controle, apenas com meio de cultura, (2) tratamento de 200 nM de *siCy5 naked* durante 24 horas, (3) tratamento com IO-Caf@CaP/siCy5/PEG-PAsp (NP/Cy5) por 24 horas sem imã e (4) tratamento com IO-Caf@CaP/siCy5/PEG-PAsp (NP/Cy5) com 1 hora de campo magnético externo, as imagens da linha superior são em contraste de fase e a inferior em

fluorescência; b) Taxa de co-localização do siCy5 e lisossomo/endossomo. Cada barra representa a média \pm EPM (n=2). Para análise estatística foi utilizado one-way ANOVA, seguido do teste de Dunnett. * $p < 0,05$, comparando com o controle (siCy5 Naked).

Importante destacar que a fluorescência observada referente ao fluoróforo Cy5 apenas é observada quando a molécula de siRNA estiver afastada da nanopartícula de óxido de ferro. Isso acontece devido ao fenômeno chamado de *quenching* de fluorescência, o qual se refere à capacidade de certos materiais como o óxido de ferro (CHEKINA *et al.*, 2011) de diminuir a intensidade de fluorescência emitida por um fluoróforo (LAKOWICZ, 2006). Desta forma, a energia emitida pelo Cy5 da molécula de siRNA não será captada enquanto a nanopartícula de óxido de ferro estiver próxima.

5.4.2 Silenciamento gênico mediado por RNA de interferência

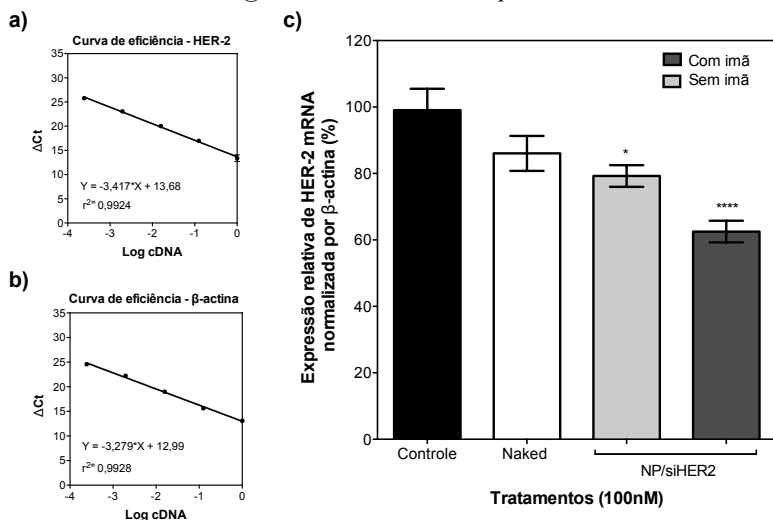
Com o objetivo de avaliar tanto a eficiência das IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp em carrear de forma segura e eficiente a molécula de siRNA quanto a efetividade da sequência em promover o efeito de interferência, foi avaliado o nível de mRNA HER-2 nas células HCC1954 por meio da técnica de qRT-PCR. O gene HER-2 foi selecionado uma vez que representa um potente alvo para a terapia anticâncer, devido às graves consequências geradas pela superexpressão da proteína HER-2 no câncer de mama (TAI; MAHATO; CHENG, 2010).

Células com superexpressão de HER-2, linhagem HCC1954, foram tratadas com 100 nM de siHER2 livre (*naked*) e 100 nM de siHER2 carreado pelas IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp com e sem aplicação de campo magnético externo. Após 60 min de magnetização o meio de cultura de todos os tratamentos foi trocado e as células ficaram armazenadas na estufa a 37°C e 5% CO₂, durante 48 horas. Na Figura 23 é possível observar a quantificação dos níveis de mRNA HER-2 encontrados. O siHER2 livre (*naked*) gerou um silenciamento de apenas 14% \pm 11, enquanto que a utilização das IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp mostrou silenciamento significativo de 21% \pm 9, em relação ao controle. Quando aplicado estímulo magnético por 60 minutos, o efeito inibitório mostrou-se ainda maior, com redução estatisticamente significativa de 37% \pm 8 da expressão do gene HER-2, comparada ao controle.

Diante disto, percebe-se que as IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp que sofreram estímulo magnético promoveram um silenciamento

superior às nanopartículas sem o estímulo. Desta forma, verifica-se a efetividade da força magnética em estimular uma maior captação das nanopartículas pelas células devido ao direcionamento físico, e consequentemente maior silenciamento do gene HER-2. Este resultado corrobora o resultado demonstrado na Figura 20, em que a quantificação de ferro intracelular foi significativamente maior após o uso do campo magnético. De forma complementar, quando utilizado o nanocarreador o efeito RNAi foi mais efetivo quando comparado com a aplicação da simples molécula de siRNA livre, evidenciando a importância da utilização de sistemas de entrega para uma terapia mais eficaz (KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012; KU *et al.*, 2014).

Figura 23: Expressão do gene HER-2 na linhagem celular HCC1954 após tratamento com IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp.



a) Curva de eficiência do gene HER-2; b) Curva de eficiência do gene β-actina; c) Avaliação do silenciamento gênico nas células HCC1954, após tratamento de siHER2 livre (*naked*) ou incorporado às IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp (NP/siHER2) com e sem exposição ao campo magnético externo por 60 minutos. Porcentagem absoluta de mRNA HER-2 normalizada pela de β-actina. Cada barra representa a média \pm EPM (n=1). Para análise estatística foi utilizado one-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. *p < 0,1, ***p < 0,0001.

6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

De acordo com as análises e resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A sequência de siRNA desenvolvida para o gene HER-2, mostrou ser efetiva em promover o silenciamento gênico *in vitro* na linhagem celular HCC1954 de câncer de mama HER-2 positivo, após a entrega com as nanopartículas.

- Nanopartículas IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp mostraram ser promissoras como sistemas de entrega controlada de siRNA para a terapia por RNAi. Apresentaram-se como monodispersão com tamanho, forma e carga superficial adequados para aplicação biomédica.

- O sistema desenvolvido mostrou ser estável após 42 dias armazenamento a baixa temperatura (4°C) e em contato com o meio de cultura suplementado com 20% de SFB, bem como após liofilização.

- IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp foram eficientes em incorporar moléculas de siRNA.

- As nanopartículas responderam de forma efetiva à aplicação de campo magnético externo, sendo passíveis de vetorização.

- A formulação das IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp não apresentou toxicidade à linhagem HCC1954 mesmo na concentração máxima avaliada.

- Células HCC1954 apresentaram uma maior captação das nanopartículas IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp quando aplicado campo magnético externo para o direcionamento ativo às células.

- IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp mostraram ser sistemas de entrega eficientes em carrear o siRNA à célula alvo, realizar o escape endossomal e promover o silenciamento do gene HER-2 em linhagem celular de câncer de mama HER-2 positivo.

7. CONCLUSÕES

Diante dos dados obtidos, pode-se concluir que as novas nanopartículas IO-caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp apresentaram-se como sistemas nanocarreadores promissores para a terapia por RNA de interferência. Possuem tamanho, forma e carga superficial biocompatíveis e mostraram-se estáveis após a alta incorporação de siRNA. Através da aplicação de campo magnético externo as nanopartículas foram responsíveis à vetorização física, favorecendo o acúmulo e aumentando a eficiência do silenciamento do gene HER-2. Desta forma, as novas nanopartículas magnéticas surgem com o potencial de nanocarreadores de siRNA passíveis de direcionamento por campo magnético externo, para melhorar a eficiência da entrega de siRNA *in vivo* e estabelecer a terapia pelo efeito de RNAi.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados descritos neste trabalho garantiram conclusões interessantes, porém alguns estudos complementares podem ser realizados. Desta forma, as perspectivas para o estudo são:

- Avaliar o poder do siHER2 em inibir a proliferação celular de linhagem celular de câncer de mama HER-2 positivo;
- Avaliar possíveis alterações no ciclo celular após transfecção com IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp;
- Realizar testes de invasão 3D com células tratadas com IO-Caf@CaP/siHER2/PEG-PAsp;
- Avaliar a formulação quando sintetizada com duas sequências de siRNA diferentes;
- Avaliar o silenciamento celular dos genes HER-2 e VEGF concomitantemente;
- Realizar testes *in vivo* a fim de avaliar a eficiência do sistema nanocarreador desenvolvido em promover a terapia de RNAi.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W *et al.* Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Adv Drug Deliv Rev** v. 58, n. 15, p. 1688–1713 , 2006.

ACS. *Can breast cancer be found early?* Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-detection>>. Acesso em: 18 jan. 2016a.

ACS. *Symptoms of Breast Cancer.* Disponível em: <http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/symptoms>. Acesso em: 18 jan. 2016.

ACS. *Types of breast cancers.* Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types>>. Acesso em: 18 jan. 2016b.

ACS. *What are the risk factors for breast cancer?* Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-risk-factors>>. Acesso em: 18 jan. 2016c.

ADEREM, Alan; UNDERHILL, David M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev of Immunol**, v. 17, n. 1, p. 593–623 , 1999.

AHMAD, Aamir. Pathways to breast cancer recurrence. **ISRN Oncology** v. 2013, p. 16 , 2013.

AIGNER, A *et al.* Expression of a truncated 100 kDa HER2 splice variant acts as an endogenous inhibitor of tumour cell proliferation. **Oncogene** v. 20, n. 17, p. 2101–2111 , 2001.

AMERES, Stefan Ludwig; MARTINEZ, Javier; SCHROEDER, Renee. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. **Cell** v. 130, n. 1, p. 101–112 , 2007.

AMSTAD, Esther *et al.* Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol-derived anchor groups. **Nano Lett** v. 9, n. 12, p. 4042–4048 , 2009.

ARTEAGA, Carlos L. *et al.* Treatment of HER2-positive breast cancer:

current status and future perspectives. **Nat Rev Clin Oncol** v. 9, n. 1, p. 16–32 , 2011.

BARTLETT, Derek W; DAVIS, Mark E. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. **Nucleic Acids Res** v. 34, n. 1, p. 322–333 , 2006.

BASEL, Matthew T. *et al.* Cell-delivered magnetic nanoparticles caused hyperthermia-mediated increased survival in a murine pancreatic cancer model. **Int J Nanomedicine** v. 7, p. 297–306 , 2012.

BERCHUCK, A *et al.* Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. **Cancer Res** v. 50, n. 13, p. 4087–4091 , 1990.

BERTRAND, Nicolas *et al.* Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Adv Drug Deliv Rev** v. 66, p. 2–25 , 2014.

BISHT, Savita *et al.* pDNA loaded calcium phosphate nanoparticles: highly efficient non-viral vector for gene delivery. **Int J Pharm** v. 288, n. 1, p. 157–168 , 2005.

BLANCO, Elvin; SHEN, Haifa; FERRARI, Mauro. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nat Biotechnol** v. 33, n. 9, p. 941–951 , 2015.

BOGREN, Sara *et al.* Classification of Magnetic Nanoparticle Systems—Synthesis, Standardization and Analysis Methods in the NanoMag Project. **Int J Mol Sci** v. 16, n. 9, p. 20308–20325 , 2015.

BOLTE, S; CORDELIERES, F P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. **J Microscopy** v. 224, n. Pt 3, p. 213–232 , 2006.

BRUNO, Katharina. Using drug-excipient interactions for siRNA delivery. **Adv Drug Deliv Rev** v. 63, n. 13, p. 1210–1226 , 2011.

BUILDING. Thomas. **Electron microscopy procedures manual**. Fred Hutchinson Cancer Research Center Washington, 2010.

CAO, Quanliang; HAN, Xiaotao; LI, Liang. Enhancement of the efficiency of magnetic targeting for drug delivery: Development and evaluation of magnet system. **J Magn Magn Mater** v. 323, n. 15, p. 1919–1924 , 2011.

CASTIGLIONI, F *et al.* Role of exon-16-deleted HER2 in breast carcinomas. **Endocr Relat Cancer** v. 13, n. 1, p. 221–232 , 2006.

CDC. *How Is Breast Cancer Diagnosed?* Disponível em: <http://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/diagnosis.htm>. Acesso em: 18 jan. 2016.

CERIOTTI, F; CERIOTTI, G. Improved direct specific determination of serum iron and total iron-binding capacity. **Clin Chem** v. 26, n. 2, p. 327–331 , 1980.

CHA, Eui-Joon *et al.* Development of MRI/NIRF “activatable” multimodal imaging probe based on iron oxide nanoparticles. **J Control Release** v. 155, n. 2, p. 152–8 , 2011.

CHAO, Wan-Ru *et al.* HER2 amplification and overexpression are significantly correlated in mucinous epithelial ovarian cancer. **Hum Pathol** v. 45, n. 4, p. 810–6 , 2014.

CHEKINA, Nataliya *et al.* Fluorescent magnetic nanoparticles for biomedical applications. **J Mater Chem** v. 21, p. 7630–7639 , 2011.

CHIN, Suk Fun; IYER, K. Swaminathan; RASTON, Colin L. Facile and Green Approach To Fabricate Gold and Silver Coated Superparamagnetic Nanoparticles. **Crystal Growth & Design** v. 9, n. 6, p. 2685–2689 , 2009.

CHOMOUCKA, Jana *et al.* Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. **Pharmacol Res** v. 62, n. 2, p. 144–149 , 2010.

CHOUDHURY, Aniruddha *et al.* Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/Neu gene, upregulates HLA class I and induces apoptosis of Her2/Neu positive tumor cell lines. **Int J Cancer** v. 108, n. 1, p. 71–77 , 2004.

CHUMSRI, Saranya. Dual HER2 blockade in the neoadjuvant and adjuvant treatment of HER2-positive breast cancer. **Breast Cancer (Dove Med Press)** p. 321–335 , 2015.

CIRQUEIRA, Magno Belém *et al.* Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina** v. 39, n. 10, p. 499–503 , 2011.

CITRI, Ami; YARDEN, Yosef. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. **Nat Rev Mol Cell Biol** v. 7, p. 505–516 , 2006.

COLE, Adam J *et al.* Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. **Biomaterials** v. 32, n. 26, p. 6291–6301 , 2011.

CONDE, João *et al.* 15 years on siRNA delivery: Beyond the State-of-the-Art on inorganic nanoparticles for RNAi therapeutics. **Nano Today** v. 10, n. 4, p. 1–30 , 2015.

CORNARD, Jean-Paul; CAUDRON, Alexandra; MERLIN, Jean-Claude. UV–visible and synchronous fluorescence spectroscopic investigations of the complexation of Al(III) with caffeic acid, in aqueous low acidic medium. **Polyhedron** v. 25, n. 11, p. 2215–2222 , 2006.

CURTIS, Christina *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature** 10.1038/nature10983, v. 486, n. 7403, p. 346–352 , 2012.

DALMINA, Milene. **Desenvolvimento, preparação e aplicação de nanopartículas magnéticas para o carregamento de siRNA para interferência na expressão do gene VEGF em linhagem celular de câncer de mama.** (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, 2015. p. 1689-1699.

DAVIS, Mark E *et al.* Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. **Nature** v. 464, n. 7291, p. 1067–1070 , 2010.

DAVIS, Mark E; CHEN, Zhuo Georgia; SHIN, Dong M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. **Nat Rev Drug Discov** v. 7, n. 9, p. 771–782 , 2008.

DE MONTFERRAND, Caroline *et al.* Iron oxide nanoparticles with sizes, shapes and compositions resulting in different magnetization signatures as potential labels for multiparametric detection. **Acta Biomaterialia** v. 9, n. 4, p. 6150–6157 , 2013.

DENT, Susan *et al.* HER2-targeted therapy in breast cancer: a systematic review of neoadjuvant trials. **Cancer Treat Rev** v. 39, n. 6, p. 622–31 , 2013.

DESAI, M P *et al.* The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. **Pharm Res** v. 14, n. 11, p. 1568–1573 , 1997.

DESANTIS, Carol E. *et al.* Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. **CA Cancer J Clin** v. 66, n. 1, p. 31 – 42 , 2015.

DEVINCENZO, John *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. **PNAS**, v. 107, n. 19, p. 8800–8805 , 2010.

DIFIGLIA, M *et al.* Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. **PNAS**, v. 104, n. 43, p. 17204–17209 , 2007.

DING, Hong-ming; MA, Yu-qiang. Interactions between Janus particles and membranes. **Nanoscale** v. 4, n. 4, p. 1116–1122 , 2012.

DOMINSKA, M.; DYKXHOORN, D. M. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. **J Cell Sci** v. 123, n. 8, p. 1183–1189 , 2010.

DONOVAN, Norma O. **Mechanisms of resistance to lapatinib in HER2-positive breast cancer A thesis submitted for the degree of PhD The work in this thesis was carried out under the supervision of.** (Tese de Doutorado) National Institute for Cellular Biotechnology. School of Biotechnology. Dublin, p. 2012. 299.

DORNIANI, Dena *et al.* Preparation of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coated with gallic acid for drug delivery. **Int J Nanomedicine** v. 7, p.

5745–5756 , 2012.

DYKXHOORN, Derek M; LIEBERMAN, Judy. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. **Annu Rev Med** v. 56, n. 4, p. 401–423 , 2005.

ELBASHIR, Sayda M *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature** 10.1038/35078107, v. 411, n. 6836, p. 494–498 , 2001.

EROLES, Pilar *et al.* Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev** v. 38, n. 6, p. 698–707 , 2012.

ESPOSITO, Carla Lucia *et al.* Aptamer-mediated selective delivery of short RNA therapeutics in cancer cells. **J RNAi Gene Silencing** v. 10, p. 500–506 , 2014.

ESTELRICH, Joan *et al.* Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. **Int J Mol Sci** v. 16, n. 4, p. 8070–8101 , 2015.

FALTUS, Timo *et al.* Silencing of the HER2/neu Gene by siRNA Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in HER2/neu-Overexpressing Breast Cancer Cells. **Neoplasia** v. 6, n. 6, p. 786–795 , 2004.

FERLAY, J *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** v. 136, n. 5, p. 359–386 , 2014.

FEWSTER, Paul F. A new theory for X-ray diffraction. **Acta Cryst** v. 70, n. 3, p. 257–282 , 2014.

FILIPE, Vasco; HAWE, Andrea; JISKOOT, Wim. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharm Res** v. 27, n. 5, p. 796–810 , 2010.

FIRE, A *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** v. 391, n. 6669, p.

806–811 , 1998.

FISH, W W. Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. **Methods in Enzymology** v. 158, p. 357–364 , 1988.

FORD, Lance P; TOLOUE, Masoud M. Delivery of RNAi mediators. **Wiley Interdiscip Rev RNA** v. 1, n. 2, p. 341–50 , 2010.

FRANÇA, Natália Regine *et al.* Interferência por RNA : Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Rev Bras Reumatol** v. 50, n. 6 , 2010.

FRANKS, Felix. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. **Eur J Pharm Biopharm** v. 45, n. 3, p. 221–229 , 1998.

FREITAS, Claudia Sondermann. Estendendo o Conhecimento sobre a Família Her-Receptores para o Fator de Crescimento Epidérmico e seus ligantes às Malignidades Hematológicas. **Rev Bras cancerol** v. 54, n. 1, p. 79–86 , 2008.

FURUKAWA;KATAOKA., Kakizawa; Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. **J Control Release** v. 97, n. 2, p. 345–56 , 18 jun. 2004.

GAO, Kun; HUANG, Leaf. Achieving efficient RNAi therapy: progress and challenges. **APSB** v. 3, n. 4, p. 213–225 , 2013.

GARRETT, Thomas P J *et al.* The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. **Mol Cell Biol** v. 11, n. 2, p. 495–505 , 2003.

GHILDIYAL, Megha; ZAMORE, Phillip D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nat Rev Genet** v. 10, n. 2, p. 94–108 , 2009.

GIGER, Elisabeth V *et al.* Gene delivery with bisphosphonate-stabilized calcium phosphate nanoparticles. **J Control Release** v. 150, n. 1, p. 87–93 , 2011.

GRAHAM, F L; VAN DER EB, A J. A new technique for the assay of

infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virol J** v. 52, n. 2, p. 456–467 , 1973.

GRATTON, Stephanie E *et al.* The effect of particle design on cellular internalization pathways. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 105, n. 33, p. 11613–11618 , 2008.

GRAVALOS, C; JIMENO, A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. **Ann Oncol** v. 19, n. 9, p. 1523–1529 , 2008.

GRIMM, Dirk *et al.* Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. **Nature** v. 441, n. 7092, p. 537–541 , 2006.

GU, Luo *et al.* In vivo clearance and toxicity of monodisperse iron oxide nanocrystals. **ACS Nano** v. 6, n. 6, p. 4947–4954 , 2012.

GUIU, S *et al.* Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. **Ann Oncol** v. 23, n. 12, p. 2997–3006 , 2012.

GUPTA, AJAY KUMAR, Gupta; Mona. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials** v. 26, n. 18, p. 3995–4021 , 2005.

GUPTA, Ajay Kumar; GUPTA, Mona. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. **Biomaterials** v. 26, n. 13, p. 1565–1573 , 2005.

HOLE, Patrick *et al.* Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (NTA). **J Nanopart Res** v. 15, n. 2027, p. 2101 , 2013.

HUBBELL, Jeffrey A. Materials science. Enhancing drug function. **Science** v. 300, n. 5619, p. 595–596 , abr. 2003.

HYNES, N E; STERN, D F. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. **Biochim Biophys Acta** v. 1198, n. 2-3, p. 165–184 , 1994.

ILER, R.K. Multilayers of colloidal particles. **J Colloid Interface Sci** v. 21, n. 6, p. 569–594 , 1966.

INCA. *Agência de notícias -INCA estima que haverá 596.070 novos casos de câncer em 2016*. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/estimativa_incidencia_cancer_2016>. Acesso em: 18 jan. 2016.

INCA. *Atlas da Mortalidade*. Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>>. Acesso em: 18 jan. 2016a.

INCA. *Câncer de Mama - Detecção Precoce*. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/deteccao_precoce++>. Acesso em: 18 jan. 2016a.

INCA. *Câncer de Mama - Fatores de risco*. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores_de_risco_1>. Acesso em: 18 jan. 2016b.

INCA. *Câncer de Mama - Sintomas*. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/sintomas>>. Acesso em: 18 jan. 2016c.

INCA. *Controle do Câncer de Mama - Tratamento*. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/tratamento>. Acesso em: 19 jan. 2016d.

INCA. *Estimativa 2014/ Incidência de Câncer no Brasil*. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2013/apresentacao-estimativa-2014.pdf>> Acesso em: 19 jan. 2016e.

IQBAL, Nida; IQBAL, Naveed. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. **J Mol Biol** p. 1–9 , 2014.

ITAKA, Keiji *et al.* Biodegradable polyamino acid-based polycations as safe and effective gene carrier minimizing cumulative toxicity. **Biomaterials** v. 31, n. 13, p. 3707–14 , 2010.

JACKSON, Claire *et al.* Clinical Significance of HER-2 Splice Variants

in Breast Cancer Progression and Drug Resistance. **Int J Biochem Cell Biol** v. 2013, p. 1 – 9 , 2013.

JANA, Nikhil R *et al.* Cysteine-functionalized polyaspartic acid: a polymer for coating and bioconjugation of nanoparticles and quantum dots. **Langmuir** v. 26, n. 9, p. 6503–6507 , 2010.

JEONG, Ji Hoon; PARK, Tae Gwan; KIM, Sun Hwa. Self-assembled and nanostructured siRNA delivery systems. **Pharm Res** v. 28, n. 9, p. 2072–2085 , 2011.

JOHN, Matthias *et al.* Effective RNAi-mediated gene silencing without interruption of the endogenous microRNA pathway. **Nature** v. 449, n. 7163, p. 745–747 , 2007.

JONES, Charles H *et al.* Contemporary approaches for nonviral gene therapy. **Discov Med** v. 19, n. 107, p. 447–454 , 2015.

JONES, J T; AKITA, R W; SLIWKOWSKI, M X. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. **FEBS Lett** v. 447, n. 2-3, p. 227–231 , 1999.

JOO, Min Kyung *et al.* The potential and advances in RNAi therapy: Chemical and structural modifications of siRNA molecules and use of biocompatible nanocarriers. **J Control Release** v. 193, p. 113–121 , 2014.

JORDAN, M; SCHALLHORN, A; WURM, F M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. **Nucleic Acids Res** v. 24, n. 4, p. 596–601 , 1996.

JUSTMAN, Quincey a; CLINTON, Gail M. Herstatin, an autoinhibitor of the human epidermal growth factor receptor 2 tyrosine kinase, modulates epidermal growth factor signaling pathways resulting in growth arrest. **J Biol Chem** v. 277, n. 23, p. 20618–20624 , 2002.

KAKIZAWA, Y. *et al.* Size-Controlled Formation of a Calcium Phosphate-Based Organic-Inorganic Hybrid Vector for Gene Delivery Using Poly(ethylene glycol)-block-poly(aspartic acid). **Adv Mater** v. 16, n. 8, p. 699–702 , 2004.

KAKIZAWA, Yoshinori; FURUKAWA, Sanae; KATAOKA, Kazunori. Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. **J Control Release** v. 97, n. 2, p. 345–356 , 2004.

KAKIZAWA, Yoshinori; KATAOKA, Kazunori. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. **Adv Drug Deliv Rev** v. 54, n. 2, p. 203–222 , 2002.

KANNAN, RangaramanujamM; XU, Qingguo; KAMBHAMPATI, SivaP. Nanotechnology approaches for ocular drug delivery. **Middle East Afr J Ophthalmol** v. 20, n. 1, p. 26 , 2013.

KATAOKA, K; HARADA, A; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Adv Drug Deliv Rev** v. 47, n. 1, p. 113–131 , 2001.

KERN, J A *et al.* Mechanisms of p185HER2 expression in human non-small cell lung cancer cell lines. **Am J Respir Cell Mol Biol** v. 6, n. 4, p. 359–363 , 1992.

KESHARWANI, Prashant; GAJBHIYE, Virendra; JAIN, Narendra Kumar. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. **Biomaterials** v. 33, n. 29, p. 7138–7150 , 2012.

KHOKHAR, Santosh; OWUSU APENTEN, Richard.K. Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. **Food Chem** v. 81, n. 1, p. 133–140 , 2003.

KIM, Hyun Jin *et al.* siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. **Biomaterials** v. 35, n. 15, p. 4548–56 , 2014.

KIRKLAND, J J. Porous Thin-Layer Modified Glass Bead Supports for Gas Liquid Chromatography. **Anal Chem**, v. 37, n. 12, p. 1458–1461 , 1965.

KLINCK, Roscoe *et al.* Multiple alternative splicing markers for ovarian cancer. **Cancer Res** v. 68, n. 3, p. 657–663 , 2008.

KOLETSA, Triantafyllia *et al.* A splice variant of HER2 corresponding to Herstatin is expressed in the noncancerous breast and in breast carcinomas. **Neoplasia** v. 10, n. 7, p. 687–696 , 2008.

KOSHKARYEV, Alexander *et al.* Immunoconjugates and long circulating systems: origins, current state of the art and future directions. **Adv Drug Deliv Rev** v. 65, n. 1, p. 24–35 , 2013.

KU, Sook Hee *et al.* Tumor-Targeting Multifunctional Nanoparticles for siRNA Delivery: Recent Advances in Cancer Therapy. **Adv Healthc Mater** v. 3, n. 8, p. 1182–1193 , 2014.

KUHN, Dagmar A *et al.* Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. **Beilstein J Org Chem** v. 5, p. 1625–1636 , 2014.

KÜMLER, Iben; TUXEN, Malgorzata K.; NIELSEN, Dorte Lisbet. A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer. **Cancer Treat Rev** v. 40, n. 2, p. 259–270 , 2014.

KUNZ, Peter C *et al.* Metal carbonyls supported on iron oxide nanoparticles to trigger the CO-gasotransmitter release by magnetic heating. **Chem Commun** v. 49, n. 43, p. 4896–4898 , 2013.

LAKOWICZ, Joseph R. Quenching of Fluorescence. In: SPRINGER. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd. ed, 2006. p. 277–330.

LALATONNE, Yoann *et al.* Bis-phosphonates-ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a platform towards diagnosis and therapy. **Chem Commun** n. 22, p. 2553–2555 , 2008.

LAMKOWSKY, Marie Christin *et al.* Magnetic field-induced acceleration of the accumulation of magnetic iron oxide nanoparticles by cultured brain astrocytes. **J Biomed Mater Res A** v. 100 A, n. 2, p. 323–334 , 2012.

LAURENT, Sophie *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chem Rev** v. 108, n. 6, p. 2064–2110 , 2008.

LAURENT, Sophie *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges. **Expert Opin Drug Deliv** v. 11, n. 9, p. 1449–70, 2014.

LEE, Hee Eun *et al.* Clinical significance of intratumoral HER2 heterogeneity in gastric cancer. **Eur J Cancer** v. 49, n. 6, p. 1448–1457, 2013.

LEGODI, M; DEWAAL, D. The preparation of magnetite, goethite, hematite and maghemite of pigment quality from mill scale iron waste. **Dyes Pigm** v. 74, n. 1, p. 161–168, 2007.

LEIVONEN, Suvi Katri *et al.* High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. **Mol Oncol** v. 8, n. 1, p. 93–104, 2014.

LENNON, Sian *et al.* Utility of serum HER2 extracellular domain assessment in clinical decision making: pooled analysis of four trials of trastuzumab in metastatic breast cancer. **J Clin Oncol** v. 27, n. 10, p. 1685–1693, 2009.

LI, Jun *et al.* Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. **J Control Release** v. 142, n. 3, p. 416–421, 2010.

LI, Tianshu; TAKEOKA, Shinji. Enhanced cellular uptake of maleimide-modified liposomes via thiol-mediated transport. **Int J Nanomedicine** v. 9, n. 1, p. 2849–2861, 2014.

LI, Yan; CHEN, ZhongWen; GU, Ning. In vitro biological effects of magnetic nanoparticles. **Chin Sci Bull** v. 57, n. 31, p. 3972–3978, 2012.

LIANG, Yulong *et al.* siRNA-based targeting of cyclin E overexpression inhibits breast cancer cell growth and suppresses tumor development in breast cancer mouse model. **PLOS One** v. 5, n. 9, p. 1–10, 2010.

LIM, JitKang *et al.* Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. **Nanoscale Res Lett** v. 8, n. 1, p. 381, 2013.

LINEMANN, Thomas *et al.* Development of a novel lipophilic,

magnetic nanoparticle for in Vivo drug delivery. **Pharmaceutics** v. 5, p. 246–260 , 2013.

LIU, B *et al.* Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. **Br J Cancer** v. 82, n. 12, p. 1991–1999 , 2000.

LIU, Dan *et al.* Downregulation of Erbin in Her2-overexpressing breast cancer cells promotes cell migration and induces trastuzumab resistance. **Mol Immunol** v. 56, n. 1-2, p. 104–112 , 2013.

LIU, Kun *et al.* The siRNA cocktail targeting VEGF and HER2 inhibition on the proliferation and induced apoptosis of gastric cancer cell. **Mol Cell Biochem** v. 386, n. 1-2, p. 117–24 , 2014.

LONZA. *Section VIII: Separation of RNA in Agarose Gels.* Water. Disponível em: < http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_SourceBook_Section_VI_II_-_Separation_of_RNA_in_Agarose_Gels.pdf >. Acesso em: 15 jan. 2016.

LORUSSO, Patricia M *et al.* Trastuzumab emtansine: a unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer. **Clin Cancer Res** v. 17, n. 20, p. 6437–6447 , 2011.

LOWRY, Oliver H *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem** v. 193, n. 1, p. 265–275 , 1951.

LUTEIJN, Maartje J; KETTING, Rene F. PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. **Nat Rev Genet** v. 14, n. 8, p. 523–534 , 2013.

MAHMOUDI, M. *et al.* Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **J Colloid Interface Sci** v. 336, n. 2, p. 510–518 , 2009.

MAHMOUDI, Morteza *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. **Adv Drug Deliv Rev** v. 63, n. 1-2, p. 24–46 , 2011.

MAITRA, Amarnath. Calcium phosphate nanoparticles: second-generation nonviral vectors in gene therapy. **Expert Rev Mol Diagn** v. 5, n. 6, p. 893–905, 2005.

MALVERN. *Dynamic Light Scattering - Common Terms Defined*. Inform White Paper. Malvern Guides Disponível em: <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2016.

MALVERNS. *Number and volume size distributions*. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/support/resource-center/application-notes/AN140403NumberVolumeSizeDistributions.aspx>>. Acesso em: 16 jan 2016.

MANJUNATH, N; DYKXHOORN, Derek M. Advances in synthetic siRNA delivery. **Discov Med** v. 9, n. 48, p. 418–430, 2010.

MARCHINI, Cristina *et al.* The human splice variant $\delta 16$ HER2 induces rapid tumor onset in a reporter transgenic mouse. **PLOS One** v. 6, n. 4, p. 1 – 7, 2011.

MARTIN, Heather L; SMITH, Laura; TOMLINSON, Darren C. Multidrug-resistant breast cancer : current perspectives. **Breast Cancer (Dove Med Press)** v. 6, p. 1–13, 2014.

MAY, Felicity E B; FELICITY, Correspondence; MAY, E B. Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha : their therapeutic potential in breast cancer. **Cancer Manag Res** v. 6, p. 225–252, 2014.

MCCAFFREY, Anton P *et al.* RNA interference in adult mice. **Nature** v. 418, n. 6893, p. 38–39, 2002.

MEDSCAPE. *HER2 in Breast Cancer--What Does it Mean?* Disponível em: <http://www.medscape.org/viewarticle/421097_4>. Acesso em: 19 jan. 2016.

MENDES, Marcos; HELENA, Valquíria. Envelhecimento : importante fator de risco para o câncer. **Arq Med ABC** v. 30, n. 1, p. 11 – 18, 2005.

MIELE, Evelina *et al.* Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. **Int J Nanomedicine** v. 7, p. 3637–3657, 2012.

MISRA, Ranjita; ACHARYA, Sarbari; SAHOO, Sanjeeb K. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discov Today** v. 15, n. 19-20, p. 842–850, 2010.

MITRA, Doyel *et al.* An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance. **Mol Cancer Ther** v. 8, n. 8, p. 2152–2162, 2009.

MODY, Vicky V. *et al.* Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. **Appl Nanosc** v. 4, p. 385–392, 2013.

MOK, Hyejung; ZHANG, Miqin. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-based delivery systems for biotherapeutics. **Expert Opin Drug Deliv** v. 10, n. 1, p. 73–87, 2013.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MYKHAYLYK, Olga *et al.* Magnetic nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery. **J Magn Magn Mater** v. 311, n. 1, p. 275–281, 2007.

NAHTA, Rita. New developments in the treatment of HER2-positive breast cancer. **Breast Cancer (Dove Med Press)** v. 4, p. 53–64, 2012.

NAHTA, Rita; ESTEVA, Francisco J. Herceptin: mechanisms of action and resistance. **Cancer Lett** v. 232, n. 2, p. 123–138, 2006.

NIREESHA, G R *et al.* Lyophilization / Freeze Drying - An Review. **IJNTPS** v. 3, n. 4, p. 87–98, 2013.

O'BRIEN, N. A. *et al.* Activated Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Signaling Confers Resistance to Trastuzumab but not Lapatinib. **Mol Cancer Ther** v. 9, n. 6, p. 1489–1502, 2010.

OH, Yu-Kyoung Kyoung; PARK, Tae Gwan. siRNA delivery systems

for cancer treatment. **Adv Drug Deliv Rev** v. 61, n. 10, p. 850–862 , 2009.

OHRING, Milton. **The Materials Science of Thin Films**. San Diego. Academic Press, 1992. p. 718.

OLIVEIRA, Marcelo Antonio De; YOSHIDA, Maria Irene; LIMA GOMES, Elionai Cassiana De. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim Nova** v. 34, n. 7, p. 1224–1230 , 2011.

PARK, Jae Hyung *et al.* Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. **Adv Drug Deliv Rev** v. 62, n. 1, p. 28–41 , 2010.

PATIL, Siddhesh D; RHODES, David G; BURGESS, Diane J. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. **AAPS J** v. 7, n. 1, p. E61–E77 , 2005.

PETERS, T *et al.* A new method for the determination of serum iron-binding capacity. I. **J Lab Clin Med** v. 48, n. 2, p. 274–279 , 1956.

PFEIFFER, Christian *et al.* Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. **J R Soc Interface** v. 11, n. 96, p. 20130931 , 2014.

PITTELLA, Frederico *et al.* Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. **Biomaterials** v. 32, n. 11, p. 3106–3114 , 2011.

PITTELLA, Frederico *et al.* Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. **J Control Release** v. 161, n. 3, p. 868–874 , 2012.

PITTELLA, Frederico; KATAOKA, Kazunori. Polymeric Micelles for siRNA Delivery. In: HOWARD, Kenneth A (Org.). **RNA Interference from Biology to Therapeutics SE - 8**. Springer US, 2013. p. 161–184.

PUDDU, Michela *et al.* Magnetically deliverable calcium phosphate nanoparticles for localized gene expression. **RSC Adv** v. 5, n. 13, p. 9997–10004 , 2015.

RAEMDONCK, Koen *et al.* Merging the best of both worlds: hybrid lipid-enveloped matrix nanocomposites in drug delivery. **Chem Soc Rev** v. 43, n. 1, p. 444–472 , 2014.

REINKING, Larry. *Tutorials and Examples: Of Image Analysis Using ImageJ*. Disponível em: < [http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/pdfs/ examples.pdf](http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/pdfs/examples.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2016.

REISCHL, Daniela; ZIMMER, Andreas. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. **Nanomedicine** v. 5, n. 1, p. 8–20 , 2009.

REYNOLDS, Angela *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. **Nat Biotech** v. 22, n. 3, p. 326–330 , 2004.

RIEMER, Jan *et al.* Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. **Anal Biochem** v. 331, n. 2, p. 370–375 , 2004.

RITA, Maria; COELHO, Guinancio; GOMES, De Souza. Síntese de copolímero em bloco com propriedades líquido cristalinas. **Química Nova** v. 30, n. 3, p. 636–643 , 2007.

ROCA, A G *et al.* Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **J Phys D: Appl Phys** v. 42, n. 22, p. 224002 , 2009.

ROURSGAARD, Martin *et al.* Variability in Particle Size Determination by Nanoparticle Tracking Analysis. **ASEM** v. 6, n. 9, p. 931–941 , 2014.

RUBIN, I; YARDEN, Y. The basic biology of HER2. **Ann Oncol** v. 12 Suppl 1, p. S3–8 , 2001.

SAFI, M. *et al.* The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. **Biomaterials** v. 32,

n. 35, p. 9353–9363 , 2011.

SARASWATHY, Manju; GONG, Shaoqin. Recent developments in the co-delivery of siRNA and small molecule anticancer drugs for cancer treatment. **Mater Today** v. 17, n. 6, p. 1–9 , 2014.

SCHECHTER, A L *et al.* The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. **Nature** v. 312, n. 5994, p. 513–516 , 1984.

SCHNEIDER, Caroline a; RASBAND, Wayne S; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods** v. 9, n. 7, p. 671–675 , 2012.

SCOTT, G K *et al.* A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. **Mol Cell Biol** v. 13, n. 4, p. 2247–2257 , 1993.

SHIH, C *et al.* Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. **Nature** v. 290, n. 5803, p. 261–264 , 1981.

SIERRA-RESTREPO, Jelver Alexander. **Sistemas Biomiméticos na síntese de nanopartículas de ouro para aplicações biomédicas e biotecnológicas**. (Tese de doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina, 2015. 114 p.

SIU, King Sun *et al.* Non-covalently functionalized single-walled carbon nanotube for topical siRNA delivery into melanoma. **Biomaterials** v. 35, n. 10, p. 3435–3442 , 2014.

STENEHJEM, David D *et al.* Assessment of HER2 testing patterns , HER2 disease , and the utilization of HER2-directed therapy in early breast cancer. **Breast Cancer (Dove Med Press)** v. 6, p. 169–177 , 2014.

STOJCESKI, T K; MALPAS, J S; WITTS, L J. Studies on the serum iron-binding capacity. **J Clin Pathol** v. 18, n. 4, p. 446–452 , 1965.

SUN, Zhizhi *et al.* Characterization of cellular uptake and toxicity of aminosilane-coated iron oxide nanoparticles with different charges in

central nervous system-relevant cell culture models. **Int J Nanomedicine** v. 8, p. 961–970 , 2013.

TAI, Wanyi; MAHATO, Rubi; CHENG, Kun. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. **J Control Release** v. 146, n. 3, p. 264–275 , 2010.

TAI, Wanyi; QIN, Bin; CHENG, Kun. Inhibition of breast cancer cell growth and invasiveness by dual silencing of HER-2 and VEGF. **Mol Pharm** v. 7, n. 2, p. 543–556 , 2010.

THOMAS, Clare E; EHRHARDT, Anja; KAY, Mark A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. **Nat Rev Genet** v. 4, n. 5, p. 346–358 , 2003.

TOMBÁ CZ, E *et al.* Magnetite in Aqueous Medium: Coating Its Surface and Surface Coated With It. **Rom Rep Phys** v. 58, n. 3, p. 281–286 , 2006.

TRUONG, Nghia P *et al.* The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. **Expert Opin Drug Deliv** v. 12, n. 1, p. 129 – 142 , 2014.

TURAL, Bilsen; ÖZKAN, Necati; VOLKAN, Murvet. Preparation and characterization of polymer coated superparamagnetic magnetite nanoparticle agglomerates. **J Phys Chem Solids** v. 70, n. 5, p. 860–866 , maio 2009.

VANONI, Caio Raphael; SIERRA-RESTREPO, Jelver Alexander; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz. Desenvolvimento de nanopartículas bimetálicas com potencialidades na área biológica, **Universidade Federal de Santa Catarina**, Relatório Final PIBITI Florianópolis, 2014.

VENABLES, Julian P. Aberrant and alternative splicing in cancer. **Cancer Res** v. 64, n. 21, p. 7647–7654 , 2004.

VENABLES, Julian P *et al.* Identification of alternative splicing markers for breast cancer. **Cancer Res** v. 68, n. 22, p. 9525–9531 , 2008.

VICENTINI, Fabiana Testa Moura de Carvalho *et al.* Delivery Systems and Local Administration Routes for Therapeutic siRNA. **Pharm Res** v. 30, n. 4, p. 915–931 , 2013.

VINBERG, Frans; KOSKELAINEN, Ari. Calcium sets the physiological value of the dominant time constant of saturated mouse rod photoresponse recovery. **PLOS One** v. 5, n. 9, p. e13025 , 2010.

WAEHLER, Reinhard; RUSSELL, Stephen J; CURIEL, David T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. **Nat Rev Genet** v. 8, n. 8, p. 573–587 , 2007.

WANG *et al.* Bringing cancer serological diagnosis to a new level: focusing on HER2, protein ectodomain shedding and neoepitope technology. **Future Oncol** v. 9, n. 1, p. 35–44 , 2013.

WANG, Jie *et al.* Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. **AAPS J** v. 12, n. 4, p. 492–503 , 2010.

WARD, Amanda J; COOPER, Thomas A. The pathobiology of splicing. **The Journal of pathology** v. 220, n. 2, p. 152–163 , 2010.

WHITEHEAD, Kathryn a; LANGER, Robert; ANDERSON, Daniel G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nat Rev Drug Discov** v. 8, n. 2, p. 129–138 , 2009.

WHO. *Breast cancer: prevention and control*. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

WHO. *Globocan - Breast cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>>. Acesso em: 18 jan. 2016.

WHO. *Projection of number of deaths - WORLD - By cause*. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.PROJNUMWORLD?lang=en>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

WINKLER, A W; HOFF, H E; SMITH, P K. Cardiovascular Effects of Potassium, Calcium, Magnesium, and Barium: An Experimental Study of Toxicity and Rationale of Use in Therapeutics. **The Yale Journal of**

Biology and Medicine v. 13, n. 1, p. 123–132 , out. 1940.

WITTON, Caroline J. *et al.* Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. **J Pathol** v. 200, n. 3, p. 290–297 , 2003.

XU, Cong-fei; WANG, Jun. Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. **AJPS** v. 10, n. 1, p. 1–12 , 2014.

XU, Hengyi *et al.* Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood. **Biomaterials** v. 32, n. 36, p. 9758–9765 , 2011.

YAMEEN, Basit *et al.* Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. **J Control Release** v. 190, p. 485–499 , 2014.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **Eur J Cancer** v. 37 Suppl 4, p. S3–8 , 2001.

YEN, Swee Kuan; PADMANABHAN, Parasuraman; SELVAN, Subramanian Tamil. Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles for Diagnostics, Therapy and Macromolecule Delivery. **Theranostics** v. 3, n. 12, p. 986–1003 , 2013.

YHEE, Ji Young *et al.* Cancer-targeted MDR-1 siRNA delivery using self-cross-linked glycol chitosan nanoparticles to overcome drug resistance. **J Control Release** v. 198, p. 1–9 , 2015.

YIN, Hongzhuan; LIAO, Long; FANG, Jun. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect Based Tumor Targeting : The Concept , Application and Prospect. **Sci Med Central** v. 2, p. 1–5 , 2014.

YONAM, Yusuke; WU, C; JONATHAN, P H. Layer-by-layer Nanoarchitectonics: Invention, Innovation, and Evolution. **Chem Lett** v. 43, p. 36–68 , 2014.

ZHANG, Jing; LI, Xiang; HUANG, Leaf. Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer. **J Control Release** v. 190, p. 440–450 , 2014.

ZHANG, Mingzhen; KATAOKA, Kazunori. Nano-structured composites based on calcium phosphate for cellular delivery of therapeutic and diagnostic agents. **Nano Today** v. 4, n. 6, p. 508–517 , 2009.

ZHANG, Weiqi *et al.* Inhibiting metastasis of breast cancer cells in vitro using gold nanorod-siRNA delivery system. **Nanoscale** v. 3, n. 9, p. 3923–32 , 2011.

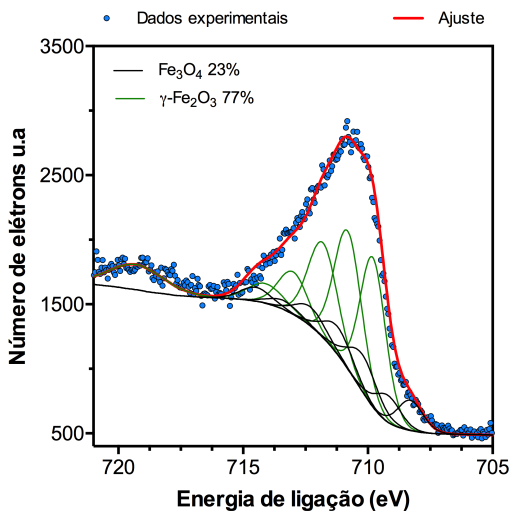
ZHOU, Yinjian; ZHANG, Chunling; LIANG, Wei. Development of RNAi technology for targeted therapy - A track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. **J Control Release** v. 193, p. 270–81 , 2014.

ZHU, Xiao-Ming *et al.* Enhanced cellular uptake of aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mammalian cell lines. **Int J Nanomedicine** v. 7, p. 953–64 , 2012.

ZIELINSKI, Rafal *et al.* HER2-affitoxin: a potent therapeutic agent for the treatment of HER2-overexpressing tumors. **Clin Cancer Res** v. 17, n. 15, p. 5071–5081 , 2011.

APÊNDICE A – Caracterização da suspensão de nanopartículas de óxido de ferro por XPS.

Espectros de fotoemissão de filmes de nanopartículas de óxido de ferro (γ -Fe₂O₃) usado na síntese da NP/siHER2



Espectro de alta resolução para o envelope FE2p_{1/2} dos óxidos de ferro sintetizados.

Fonte: (SIERRA-RESTREPO, 2015)

